



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**ANA CAROLINE DE OLIVEIRA JUNQUEIRA**

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS GENÉTICAS PARA A MELHORIA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO EM CEPAS DA LEVEDURA *KOMAGATAELLA PHAFFII***

**BRASÍLIA, DF**

**2023**

**ANA CAROLINE DE OLIVEIRA JUNQUEIRA**

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS GENÉTICAS PARA A MELHORIA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO EM CEPAS DA LEVEDURA *KOMAGATAELLA PHAFFII***

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular. Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Nádia Skorupa Parachin

Coorientador: Prof. Dr. Hugo Costa Paes

**BRASÍLIA, DF**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

a de Oliveira Junqueira, Ana Caroline Avaliação de estratégias genéticas para a melhoria da produção de ácido lático em cepas da levedura *Komagataella phaffii* / Ana Caroline de Oliveira Junqueira; orientador Nádia Skorupa Parachin; co-orientador Hugo Costa Paes. -Brasília, 2023. 106 p.

Tese(Doutorado em Biologia Molecular) -- Universidade de Brasília, 2023.

1. transportador mitocondrial de piruvato. 2. Glicerol-3 fosfato desidrogenase. 3. catalase. 4. hemoglobina. 5. glicerol bruto. I. Skorupa Parachin, Nádia , orient. II. Costa Paes, Hugo, co-orient. III. Título.

Dedico este trabalho à minha mãe, Walkiria de Oliveira, exemplo de dedicação e disciplina.

## AGRADECIMENTOS

Ao fim de quatro anos de doutorado, dos quais dois anos tivemos uma pandemia, seria difícil enumerar aqui todos que de alguma forma me auxiliaram nesta trajetória. Foram vários colegas de moradia, de bancada de laboratório, professores, técnicos, entre tantos outros.

À minha orientadora, professora Nádia S. Parachin, por ter me concedido esta oportunidade. Obrigada por abrir as portas de seu laboratório para me receber mesmo eu tendo pouca experiência em biologia molecular à época.

Ao meu coorientador, professor Hugo C. Paes, que me acompanhou intensamente desde o meu segundo ano de doutorado. Acredito que podemos aprender muito pelo exemplo e tive a honra de aprender muito sobre o que é ser um professor e pesquisador. Sou grata por sua dedicação em cada etapa deste doutorado, desde ir para a bancada do laboratório demonstrar alguma técnica, às correções da tese, incentivo e conselhos.

Apesar da breve convivência, pude compartilhar o Laboratório de Biocatalisadores com colegas excelentes, Nadielle, João Heitor, Milton, Kelly, Gabriel, André, Carol, Daniel, Enzo, Gio e Gabi. Obrigada pelos bons momentos dentro e fora do laboratório. Em especial Nady e João por tanto conhecimento compartilhado.

Aos colegas do PPG Biologia Molecular da Unb pelas conversas, compartilhamento de reagentes, equipamentos e protocolos. Em especial Luiza, Ana Laura, Roberta e Igor, pelos conselhos sobre a *K. phaffii*.

À professora Talita Souza Carmo pelas conversas, amparo e incentivo. Aos professores do PPG Biomol que contribuíram para minha formação.

Aos meus “colegas triviais” do mestrado no PPGEGBB que continuam presentes mesmo que fisicamente distantes, pelas risadas, apoio e carinho. Em especial Marcela e Natânia que me apoiaram durante o processo de mudança para Brasília e Antônio, que atualmente também trabalha com ácido láctico, por ter participado da banca de qualificação.

Ao meu namorado, Lucas, pela paciência, apoio e companheirismo. Estendo o agradecimento à sua família por terem me acolhido tão bem aqui.

Aos meus tios que representam a minha família aqui em Brasília, Tarcísio e Thaty, pelo acolhimento e incentivos de sempre.

Às minhas irmãs e melhores amigas, Paulinha e Gabi. Por darem tanto apoio nessa longa trajetória. Tenho certeza que a parte mais difícil das minhas mudanças foi ter ficado longe de vocês.

À minha mãe, por todo o incentivo aos estudos através do exemplo. Sempre que posso conto para todos à minha volta sobre como você ter decidido voltar a estudar mudou a minha vida. Hoje os nossos incentivos se retroalimentam e tenho honra de ver você hoje conquistando o seu mestrado.

À Juliana, minha psicóloga, por todo amparo que foi essencial durante estes quatro anos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À FAPDF que através do Edital FAP-Participa 07/2022 possibilitou a minha participação no Issy36 em Vancouver, Canadá.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e paciência para a correção deste trabalho.

“A ciência nos convida a acolher os fatos, mesmo quando eles não se ajustam às nossas concepções.”

## RESUMO

O ácido láctico é classificado como um químico plataforma devido às numerosas aplicações a que pode ser destinado industrialmente. Nos anos recentes, a maior parte da produção do ácido láctico tem sido destinada à síntese do polímero polilactídeo (PLA), um bioplástico termoestável e compostável que pode ser uma alternativa sustentável aos plásticos convencionais derivados de petróleo. Uma das vias de obtenção do ácido láctico é através da fermentação microbiana utilizando fontes de carbono renováveis. Porém, a produção via fermentação microbiana requer melhorias no bioprocessamento para que o PLA se torne comercialmente competitivo. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, a levedura *Komagataella phaffii* demonstrou capacidade de utilizar em fermentar o glicerol bruto, um subproduto da indústria do biodiesel. Assim, *K. phaffii* foi selecionada para a construção de linhagens produtoras de L-lactato, atingindo até o momento, o rendimento de 0,67 (g/g) em batelada-alimentada em hipóxia. Ao avaliar as cepas de *K. phaffii* construídas, há indícios de que as modificações anteriores, como a deleção da piruvato descarboxilase 1, resultam em um desbalanço do equilíbrio redox NADH/NAD<sup>+</sup> o que poderia explicar a produção de arabitol como coproduto e a dificuldade em melhorar o rendimento de ácido láctico. Portanto, diferentes alvos para expressão e nocaute foram avaliados neste trabalho com o objetivo de (a) corrigir o balanço redox na cepa GLp para evitar a redirecionamento do fluxo para vias competitivas; (b) viabilizar a produção de ácido láctico em aerobiose; (c) avaliar diferentes LDHs e (d) superexpressar o gene responsável pelo transportador de lactato, Jen1. Na manipulação genética de *K. phaffii*, foi possível observar que (i) a utilização da técnica de amplificação do círculo rolante para amplificação de material genético resultou em uma maior obtenção de clones; (ii) a inserção de regiões de repetições diretas para guiar a excisão se mostrou eficaz para a reciclagem de marca; (iii) integrações em *locus* com regiões repetidas resulta em instabilidade da integração. Em relação aos alvos testados para melhorar a produção de ácido láctico, concluímos que a deleção do gene do transportador mitocondrial de piruvato em *K. phaffii* não foi vantajosa, visto que houveram impactos deletérios no crescimento sem ganhos na produção de ácido láctico. As observações deste trabalho indicam que a cepa GLp cultivada em batelada-alimentada e com limitação de oxigênio é ainda a melhor candidata para a produção de ácido láctico a partir de glicerol.

Palavras-chave: 1. transportador mitocondrial de piruvato 2. Glicerol-3-fosfato desidrogenase 3. catalase 4. hemoglobina 5. glicerol bruto

## ABSTRACT

Lactic acid can be classified as a platform chemical due to its numerous industrial applications. In recent years, the lactic acid produced is mainly used for the synthesis of polylactides (PLA), a thermostable and compostable bioplastic that can replace conventional plastics derived from the petrochemical industry. One route to obtain lactic acid is through microbial fermentation using renewable carbon sources as substrate. However, microbial fermentation requires improvements in order to make PLA commercially competitive. In previous works by our group, the ability to use crude glycerol, a by-product from the biodiesel industry, by the yeast *Komagataella phaffii* was assessed. Then, *K. phaffii* was selected for the construction of L-lactate-producing strains, reaching the yield of 0.67 (g/g) in fed-batch mode in hypoxia. However, by assessing the previous strains, there are indications that the modifications, such as the deletion of pyruvate decarboxylase 1, resulted in an imbalance in the NADH/NAD<sup>+</sup> redox balance, which could explain the production of arabitol as a co-product and the difficulty in improving the yield of lactic acid. Therefore, targets of gene expression and knockout were evaluated in this work with the aim of (a) adjusting the redox balance in the GLp strain to avoid the redirection of the metabolic route into arabitol; (b) enabling the production of lactic acid under aerobic conditions; (c) evaluate different LDHs and (d) overexpress the gene responsible for the lactate transporter, Jen1. In the genetic manipulation of *K. phaffii*, it was possible to observe that (i) the use of the rolling circle amplification for the amplification resulted in a more significant number of clones; (ii) the insertion of direct repeats showed to be effective for recycling the selection marker; (iii) integrations with repeated sequences resulted in instability of gene integrations. Regarding the targets tested to improve lactic acid production, we concluded that the deletion of the mitochondrial pyruvate transporter gene in *K. phaffii* did not improve lactic acid production. The observations of this work indicate that the GLp strain grown fed-batch mode with oxygen limitation is the best candidate for the production of lactic acid from glycerol.

Keywords: 1. Mitochondrial pyruvate carrier 2. Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase  
3. catalase 4. hemoglobin 5. crude glycerol

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas isoméricas do ácido láctico e lactato.....	16
Figura 2. Mercado de ácido láctico em 2020 por uso final .....	17
Figura 3. Representação gráfica resumida das rotas de obtenção do ácido láctico ...	19
Figura 4. Reações enzimáticas que convertem glicerol a DHAP em <i>K. phaffii</i> .....	32
Figura 5. Via metabólica da produção de lactato a partir de glicerol em <i>K. phaffii</i> GLp .....	34
Figura 6. Estratégias para a produção de ácido láctico em aerobiose a partir de glicerol em <i>K. phaffii</i> desenvolvidas neste trabalho.....	38
Figura 7. Cassetes para interrupção de <i>GPD1</i> em <i>K. phaffii</i> .....	41
Figura 8. Esquema demonstrando o processo de contrasseleção para a reciclagem de marca de resistência a higromicina.....	46
Figura 9. Confirmação da construção da cepa GLp1 .....	50
Figura 10. Confirmação da cepa GLp2 .....	51
Figura 11. Placas de cultivos em meio contendo 2% ramnose (A) e 2% glicose (B) para a contrasseleção de clones para reciclagem da marca <i>Hyg<sup>R</sup></i> . ...	53
Figura 12. Confirmação da reciclagem da marca de resistência em GLp1 .....	53
Figura 13. Consumo de glicerol, produção de lactato e crescimento celular das cepas GLp1 e GLp2 em aerobiose com 6% glicerol em batelada.....	55
Figura 14. Cassete para deleção do gene <i>MPC1</i> em <i>K. phaffii</i> .....	61
Figura 15. Confirmação da construção da cepa XLm .....	65
Figura 16. Reciclagem da marca de seleção em XLm após a transformação com o cassete para deleção de <i>MPC1</i> .....	66
Figura 17. Construção das cepas XLm1 e XLm2 .....	67
Figura 18. Confirmação da reciclagem da marca de seleção em XLm após a transformação com os cassetes para deleção de <i>GPD1</i> .....	68
Figura 19. Avaliação da presença do cassete pGAP- <i>BtLDH</i> .....	69
Figura 20. Integração do plasmídeo pGAP no <i>locus</i> GAP de <i>K. phaffii</i> .....	70
Figura 21. Mapa do plasmídeo pGAPZ B utilizado para a expressão de <i>LDHs</i> (acervo pessoal).....	71
Figura 22. Transformação das cepas provenientes de XL para avaliar a expressão de 4 <i>LDHs</i> .....	72
Figura 23. Placas YPD com 0,2 mg/mL de higromicina da transformação de GLp...	73

Figura 24. Confirmação da construção da cepa GLpm .....	74
Figura 25. Vias biossintéticas de L-Isoleucina, L-Valina e L-Leucina em <i>K. phaffii</i> ...	75
Figura 26. Curvas de crescimento de cepas de <i>K. phaffii</i> .....	75
Figura 27. Curvas de crescimento, consumo de glicerol e produção de ácido láctico e coprodutos em GLP (A) e GLPm (B) do cultivo em batelada em aerobiose .....	78
Figura 28. Quantificação relativa da hemoglobina bacteriana expressa em GLpm em batelada .....	80
Figura 29. Transformações planejadas para a cepa Gp .....	85
Figura 30. Cassete de superexpressão de Jen1 com expressão do gene LDH sob o comando do promotor GAP otimizado ( $P_{A8GAP}$ ).....	87
Figura 31. Placas de transformação em meio YNB s/ aminoácidos e 2% de dextrose .....	89
Figura 32. Placas de transformação de meio SD s/ aminoácidos indicando a seleção de clones prototróficos para histidina.....	89
Figura 33. Estratégia para confirmação da inserção das duas porções do cassete..	90
Figura 34. Gel de agarose (1%) indicando a amplificação 697 pb que confirma a expressão de <i>BtLDH</i> .....	90
Figura 35. Evento de recombinação entre a região de homologia do cassete A e o gene de <i>HIS4</i> mutado de Gp.....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Leveduras e fungos geneticamente modificados para produzir ácido láctico nos últimos 10 anos. ....	22
Tabela 2. Fonte de carbono alternativas utilizadas para a produção heteróloga de ácido láctico. ....	27
Tabela 3. Plasmídeos e cepas utilizados para a deleção de GPD1 .....	41
Tabela 4. Composição das soluções de desnaturação e amplificação utilizadas no RCA .....	42
Tabela 5. Parâmetros cinéticos das cepas GLp1 e GLp2 .....	55
Tabela 6. Plasmídeos utilizados no segundo capítulo.....	62
Tabela 7. Cepas utilizadas no segundo capítulo .....	62
Tabela 8. Taxa de crescimento específico das cepas GLp e GLpm .....	76
Tabela 9. Parâmetros cinéticos da produção de ácido láctico por GLp e GLpm em batelada em aerobiose.....	77
Tabela 10. Critérios avaliados durante a escolha de LDHs.....	86
Tabela 11. Plasmídeos e cepas utilizados para a deleção de MPC1 .....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

(Genes e proteínas sem indicação de espécie são nativos de *K. phaffii*.)

xg	força gravitacional para centrifugação
μ	micro
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOXtt	terminador de transcrição da álcool oxidase 1
ARDH	arabitol desidrogenase
BAL	bactéria ácido-lática
BleoR	gene <i>Sh ble</i> de resistência a zeocina de <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>
CYC	região 3' do gene <i>CYC1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DHAP	diidroxiacetona-fosfato
DNAg	DNA genômico
EM7	promotor constitutivo de <i>Escherichia coli</i>
g	grama
G3P	glicerol 3-fosfato
<i>GPD1</i>	gene da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase citosólica
<i>GPO</i>	gene da enzima glicerol-3-fosfato oxidase de <i>Aerococcus viridans</i>
HygR	gene da higromicina fosfotransferase de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
kb	quilobase
kV	quilovolts
LDH	lactato desidrogenase
MazF	endonuclease de <i>E. coli</i>
<i>MPC1</i>	gene da subunidade 1 do transportador mitocondrial de piruvato
<i>NcCAT1</i>	gene da catalase 1 de <i>Neurospora crassa</i>
nm	nanômetro
OD <sub>600</sub>	densidade óptica medida ao comprimento de onda de 600 nm
OGM	organismo geneticamente modificado
ori	Origem de replicação bacteriana
<i>P<sub>ADH2</sub></i>	promotor da álcool desidrogenase 2 de <i>Scheffersomyces stipitis</i>
pb	pares de bases
<i>P<sub>GAP</sub></i>	promotor constitutivo do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Pdc1	piruvato descarboxilase

PLA	Polilactídeo
P <sub>LRA3</sub>	promotor da L-ramnonato desidratase, induzível na presença de ramnose
P <sub>MDH3</sub>	promotor da malato desidrogenase
P <sub>PGK1</sub>	promotor da fosfoglicerato quinase 1
P <sub>TEF1</sub>	promotor do gene do fator 1 de alongamento da transcrição de <i>S. cerevisiae</i>
RPS25Att	terminador do gene da proteína S25 da subunidade menor do ribossomo
RPS3tt	terminador do gene da proteína S3 da subunidade menor do ribossomo
TDH3tt	terminador do gene da isozima 3 da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<i>vhb</i>	gene da hemoglobina de <i>Vitreoscilla stercoraria</i>
Y <sub>P/S</sub>	rendimento da conversão de substrato em produto
Y <sub>X/S</sub>	rendimento da conversão de substrato em biomassa (X)
Ω	ohms

## SUMÁRIO

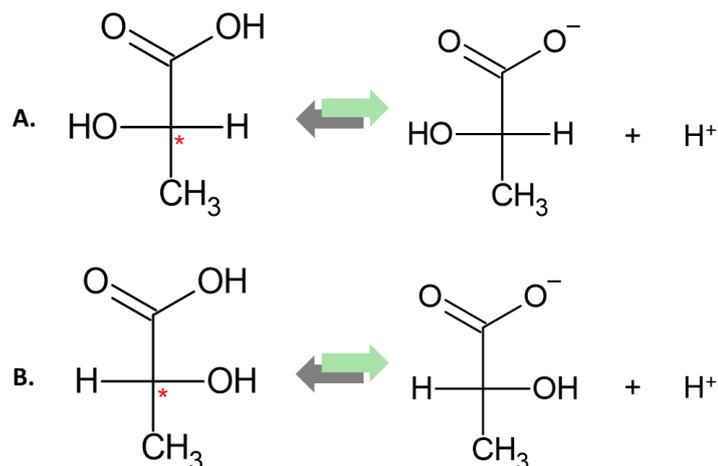
<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>1 ÁCIDO LÁTICO E O POLILACTÍDEO.....</b>	<b>16</b>
1.1 FORMAS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO .....	18
1.1.1 Fontes alternativas de carbono na produção de ácido lático por fermentação microbiana.....	27
1.1.1.1 Glicerol bruto .....	28
<b>2 A LEVEDURA <i>KOMAGATAELLA PHAFFII</i>.....</b>	<b>31</b>
2.1 METABOLISMO DE GLICEROL EM <i>K. PHAFFII</i> .....	32
2.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO EM <i>K. PHAFFII</i> .....	33
<b>PRIMEIRO CAPÍTULO: DELEÇÃO DE <i>GPD1</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>36</b>
1.1 OBJETIVOS .....	39
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
2.1 CONSTRUÇÃO DE CEPAS.....	40
2.1.1 Material genético e cepas.....	40
2.1.2 Amplificação <i>in vitro</i> de plasmídeos .....	42
2.1.3 Precipitação de DNA .....	43
2.1.4 Eletroporação de <i>K. phaffii</i> .....	43
2.1.5 PCR de colônia .....	44
2.1.6 Extração de DNA genômico de leveduras.....	45
2.1.7 Preservação de leveduras em glicerol .....	45
2.1.8 Reciclagem da marca de seleção .....	46
2.2 CULTIVO DE CEPAS E QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS.....	47
2.2.1 Batelada em meio UAB com 6% de glicerol.....	47
2.2.2 Consumo de substrato e quantificação de metabólitos .....	48
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
3.1 SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES E CONFIRMAÇÃO DE CEPAS.....	49
3.1.1 Reciclagem da marca de seleção .....	52
3.2 CULTIVO EM BIORREATOR.....	54
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>SEGUNDO CAPÍTULO: DELEÇÃO DE <i>MPC1</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>58</b>
1.1 OBJETIVOS .....	60

<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
2.1 CONSTRUÇÃO DE CEPAS.....	61
2.1.1 PCR quantitativa .....	62
2.1.1.1 Extração de RNA total utilizando FAE .....	63
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
3.1 CEPAS CONSTRUÍDAS EM XL .....	64
3.1.1 Avaliação das cepas XLm1 e XLm2.....	68
3.1.2 Reinserção do gene da LDH nas cepas provenientes de XL .....	70
3.2 CEPA GLPM .....	73
3.2.1 Seleção de clones.....	73
3.2.2 Curvas de crescimento de GLp e GLpm .....	74
3.2.3 Efeito da ausência de Mpc1 na produção de ácido lático em aerobiose .....	76
3.2.4 Expressão relativa do gene <i>vhb</i> .....	79
<b>4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>81</b>
<b>TERCEIRO CAPÍTULO: EXPRESSÃO DE DIFERENTES LDHS COM A</b>	
<b>SUPEREXPRESSÃO DE <i>JEN1</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>83</b>
1.1 OBJETIVO.....	85
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>86</b>
2.1 CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A ESCOLHA DE NOVAS LDHS.....	86
2.2 CEPAS E PLASMÍDEOS.....	87
2.3 TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO .....	88
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL E PESPECTIVAS .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE 1. ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE 2. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE 3. GÉIS DE AGAROSE DO MATERIAL GENÉTICO PARA</b>	
<b>TRANSFORMAÇÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE 4. SPOT ASSAY.....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICE 5. MEIO DIFERENCIAL PARA A SELEÇÃO DE CLONES</b>	
<b>PRODUTORES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS .....</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE 6. PRODUÇÕES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO .....</b>	<b>106</b>

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 ÁCIDO LÁTICO E O POLILACTÍDEO

O ácido 2-hidroxiopropanóico ( $C_3H_6O_3$ ) é popularmente denominado por ácido láctico devido à sua origem uma vez que foi isolado a partir do leite fermentado pelo químico Carl Wilhelm Scheele no ano de 1780 (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013). Anos depois, Pasteur relacionou a formação desta molécula com o crescimento bacterianas e descreveu o processo de fermentação láctica. A estrutura química do ácido láctico corresponde a um ácido carboxílico (-COOH) no grupo terminal e um grupo hidroxila (-OH) no carbono de posição 2, resultando em um carbono assimétrico ou quiral (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013). Desta maneira, o ácido láctico pode apresentar duas formas de isomeria óptica, L-lactato e D-lactato, como ilustrado na Figura 1.

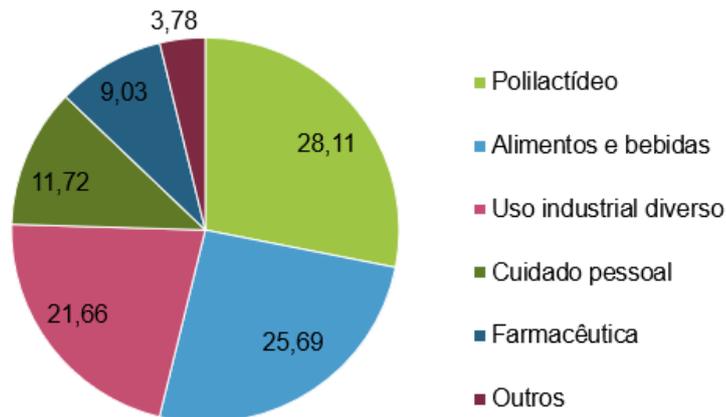


**Figura 1. Formas isoméricas do ácido láctico e lactato**

Fonte: A autora (2023). O asterisco em vermelho indica o carbono assimétrico que possibilita a formação de dois enantiômeros, (A) ácido láctico L e L-lactato e (B) ácido láctico D e D-lactato

Alguns setores industriais exigem um alto grau de pureza óptica para a aplicação do ácido láctico, visto que o D-lactato pode apresentar toxicidade aos humanos (POHANKA, 2020). Não obstante, o ácido láctico possui numerosas aplicações industriais que se devem a suas características físico-químicas, como sua leve acidez ( $pK_a=3,85$ ), sua alta higroscopicidade e sua estabilidade química e térmica (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013). Ele pode ser utilizado como acidulante, agente antimicrobiano, adjuvante de sabor e conservante na indústria de alimentos e bebidas, e

também é gerado naturalmente durante a produção de alimentos que passam pela fermentação láctica. Na indústria de cosméticos e beleza, o ácido láctico é utilizado por estimular o processo de descamação da epiderme. Em 2020 o maior setor de destino do ácido láctico, em torno de 28,11%, consistiu na fabricação de polilactídeo (PLA) (Figura 2).



**Figura 2. Mercado de ácido láctico em 2020 por uso final**

Fonte: Gráfico gerado pela autora com dados de Grand View Research (GRAND VIEW RESEARCH, INC., 2021).

O PLA é resultado da polimerização de monômeros de ácido láctico, podendo resultar em três estruturas distintas: poli-L-lactídeo (PLLA), poli-D-lactídeo (PDLA) e poli-DL-lactídeo (PDLLA) (DE FRANÇA et al., 2022). Em condições adequadas, os polímeros podem formar estereocomplexos, que são macromoléculas de composição química uniforme, mas com configuração diferente nas unidades de repetição. A formação destes estereocomplexos ocorre devido às interações intermoleculares não covalentes entre as cadeias do PLLA e PDLA, o que pode conferir características distintas ao biopolímero (BRZEZIŃSKI; BIELA, 2014). O PLA, apesar de apresentar baixa degradabilidade em água (BAGHERI et al., 2017), é biodegradável quando compostado (HAIDER et al., 2019), tornando-o um potencial substituto sustentável aos polímeros provenientes da indústria petroquímica, como o tereftalato de polietileno (PET) e o poliestireno (DE FRANÇA et al., 2022).

O PLA pode ser aplicado na produção de embalagens para alimentos de vida útil curta, como frutas e vegetais; e na produção de recipientes, copos, talheres, pratos e pires (DE FRANÇA et al., 2022). Além disso, por ser biocompatível, o PLA é também

utilizado na área biomédica. Existem relatos de seu uso na liberação controlada de fármacos e na confecção próteses e suturas, entre outros (DE FRANÇA et al., 2022). O PLLA especificamente pode ser aplicado de forma injetável com finalidade estética ou na recuperação de pacientes com lipoatrofia, por promover o preenchimento subcutâneo (BUTTERWICK; LOWE, 2009). O PLLA comercializado sob o nome Sculptra™ foi aprovado para uso em 2004 pelo FDA (*Food and Drug Administration*).

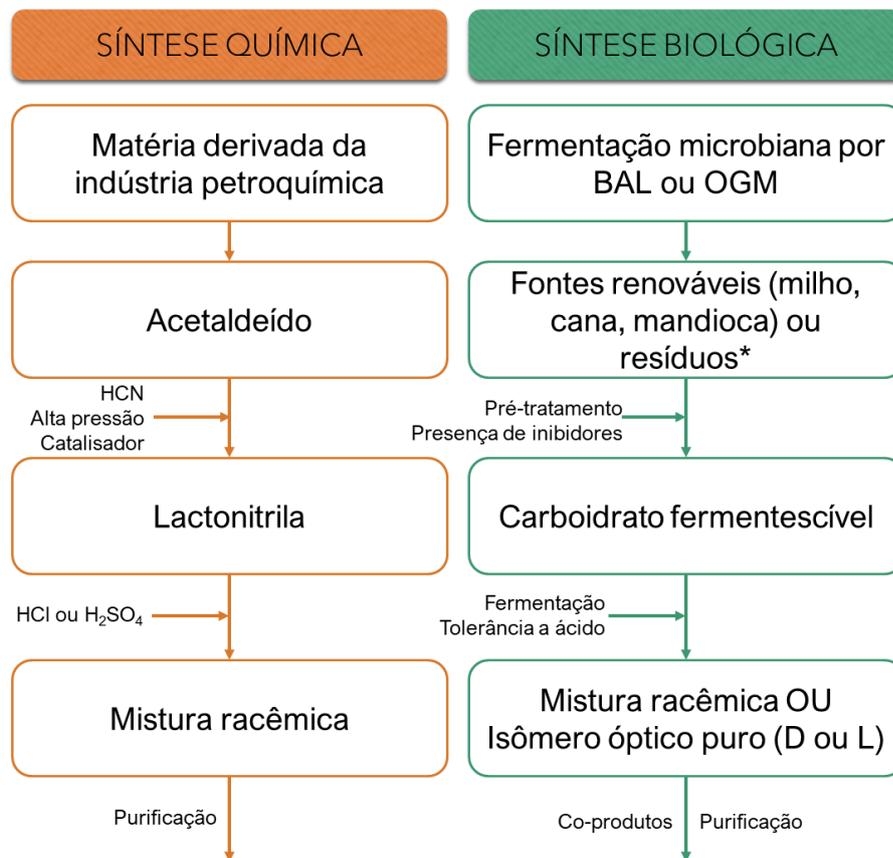
Entretanto, o desenvolvimento de processos de produção do ácido láctico, matéria-prima para a formação de PLA, devem ser aprimorados para que se torne economicamente competitivo em relação aos plásticos tradicionais derivados do petróleo. O valor do ácido láctico no mercado internacional em 2020 foi estimado em torno de 1,1 bilhão de dólares. A estimativa é que até 2025 este valor seja de aproximadamente 2,1 bilhões (GRAND VIEW RESEARCH, INC., 2021). Já para o PLA, que é um dos principais produtos gerados a partir de ácido láctico, o mercado estimado em 2020 foi de 786 milhões de dólares, com estimativa para atingir 1,7 bilhão até 2025 (GRAND VIEW RESEARCH, INC., 2021).

## 1.1 FORMAS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

A produção de ácido láctico pode ser classificada em duas vias, a síntese química e a síntese biológica. Resumidamente, a síntese química é feita a partir da molécula de lactonitrila, que resulta da adição de cianeto de hidrogênio a uma molécula de acetaldeído (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013; GHAFAR et al., 2014). Após a recuperação por destilação, a lactonitrila deve ser hidrolisada pela ação de um ácido forte, como o ácido sulfúrico ou o ácido clorídrico, para a liberação do sal de amônia e do ácido láctico. Este é purificado inicialmente pela reação de esterificação, formando o lactato de metila, que é então hidrolisado em água com adição de catalisador para a liberação das moléculas de ácido láctico e metanol (GHAFAR et al., 2014). Desta forma, a síntese química requer a utilização de catalisadores, pressão elevada e temperatura e ácidos fortes. Além disso, resulta na geração da mistura racêmica, necessitando assim de etapa extra de purificação a depender da aplicação almejada. Por estas razões, a síntese química tem sido substituída pela síntese biológica.

A síntese biológica resulta da fermentação microbiana onde o piruvato, metabólito resultando do metabolismo de carboidratos, é convertido em ácido láctico pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH). O ácido láctico é naturalmente produzido

por diversos organismos, porém, o grupo denominado bactérias ácido lácticas (BAL) se destaca por ter o ácido láctico como o principal metabólito (SAUER et al., 2017). Contudo, a produção por BAL também pode resultar numa mistura racêmica, por possuírem no genoma os genes de lactato desidrogenases (LDH) produtoras de ambos os estereoisômeros (L-LDH e D-LDH) (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013). Além disso, algumas BAL são consideradas fastidiosas, ou seja, organismos que possuem necessidades nutricionais e ambientais complexas (SAUER et al., 2017). As principais diferenças entre as duas vias de obtenção do ácido láctico estão sumarizadas na Figura 3.



**Figura 3. Representação gráfica resumida das rotas de obtenção do ácido láctico**

Fonte: A autora (2023). BAL, bactéria ácido-láctica; OGM, organismo geneticamente modificado. \*Resíduos agroindustriais e/ou lignocelulósicos.

A redução do custo da produção de ácido láctico a partir da otimização da cepa produtora e do bioprocesso é importante para que, conseqüentemente, a produção de PLA seja economicamente viável para que seu uso seja competitivo aos plásticos convencionais. Apesar dos desafios apresentados por BAL na produção de ácido

lático, como os custos de purificação de isômeros e suplementação do meio de cultivo, sua capacidade fermentativa é alta, atingindo a produção de 100 g/L e produtividade de 23 g/L/h (SAUER et al., 2010). A construção de organismos geneticamente modificados (OGM) a partir da engenharia genética e metabólica pode contribuir na melhoria do processo de produção via fermentação microbiana ao permitir avaliar rotas metabólicas que possam (i) evitar a degradação do produto; (ii) produzir apenas um isômero óptico; (iii) diminuir ou eliminar a formação de coprodutos; (iv) otimizar o transporte de ácido láctico através da membrana; entre outras possibilidades. Assim, o organismo poderá se tornar industrialmente competitivo ao se aproximar dos parâmetros de atingir alta pureza do isômero óptico (> 99%) e rendimento próximo ao máximo teórico (100%).

A cepa B0013-090B3 de *Escherichia coli*, otimizada por engenharia metabólica, apresentou o maior rendimento de conversão de substrato em ácido láctico ( $Y_{P/S}$ : 0,97) relatado na literatura (NIU et al., 2014). Esta cepa possui modificações genéticas para a inibição do desvio de carbonos para a produção de coprodutos, como o etanol e o acetato; deleção do gene da D-LDH nativa, a fim de evitar a formação da forma isomérica D; entre outras modificações genéticas. Bactérias, como o exemplo citado em *E. coli*, e leveduras podem ser utilizados para este fim. Porém, algumas bactérias de uso industrial também são fastidiosas como as BAL e, portanto, requerem suplementação do meio de cultivo. A adição de suplementos complexos ao meio de cultivo, como o extrato de levedura, podem dificultar a purificação do ácido láctico e encarecer o processo (SAUER et al., 2010). Além disso, algumas bactérias possuem tolerância limitada à acidez, característica que é inerente ao processo de produção de ácido láctico, o que pode resultar em uma demanda elevada por carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) no bioprocesso. Este é o agente neutralizador mais aplicado industrialmente devido ao seu baixo custo, mas sua adição resulta na formação de lactato de cálcio ao fim do processo, o que exige a adição de ácido sulfúrico para purificar o ácido láctico, com produção adicional de sulfato de cálcio (gesso), um resíduo com potencial poluente (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013; DJUKIĆ-VUKOVIĆ et al., 2019).

As leveduras, por outro lado, são organismos cujas demandas nutricionais podem ser atendidas por meios de cultivo definidos e baratos, e que toleraram baixos valores de pH (SAUER et al., 2010). Porém, elas não produzem ácido láctico naturalmente. A primeira construção de uma cepa de levedura para produção de ácido láctico foi descrita há quase 30 anos (1994), resultando na produção de 12 g/L numa cepa

de *Saccharomyces cerevisiae* modificada pela introdução de um vetor de multi-cópias do gene *LDH* de *Lactocaseibacillus casei* (DEQUIN; BARRE, 1994). Desde então, inúmeras estratégias genéticas foram avaliadas para a melhoria da produção de ácido láctico em outros gêneros de leveduras e fungos filamentosos. A Tabela 1 reúne as estratégias que foram implementadas para a produção de ácido láctico em leveduras e fungos reportadas nos últimos 10 anos.

Tabela 1. Leveduras e fungos geneticamente modificados para produzir ácido láctico nos últimos 10 anos.

(Continua)					
Organismo hospedeiro	LDH	Outras modificações	Produção; rendimento; produtividade	Fonte de carbono	Referência
L-lactato					
<b>Aspergillus</b>					
<i>A. oryzae</i>	<i>Bos taurus</i>	$\Delta$ ligD::sC	50,1 g/L; 0,29 g/L/h		
<i>A. oryzae</i>	<i>B. taurus</i>	Interrupção do gene <i>pdca</i>	56,4 g/L; 0,33 g/L/h		
<i>A. oryzae</i>	<i>B. taurus</i>	Interrupção do gene <i>mpcA</i>	65,4 g/L; 0,45 g/L/h	100 g/L glicose	(ZHANG et al., 2020a)
<i>A. oryzae</i>	<i>B. taurus</i>	Dupla interrupção <i>pcdA/mpcA</i>	81,2 g/L; 0,67 g/L/h		
<i>A. oryzae</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	Dupla interrupção <i>pcdA/mpcA</i>	90,1 g/L		
<i>A. oryzae</i>	<i>B. taurus</i>	Interrupção <i>LDH</i> nativa	49 g/L	100 g/L glicose	(WAKAI et al., 2014)
<i>A. niger</i>	<i>Mus musculus</i>	11 cópias de <i>LDH</i>	7,7 g/L	60 g/L glicose	(DAVE; PUNEKAR, 2015)
<b>Candida</b>					
<i>C. utilis</i>	<i>B. taurus</i>	Expressão das enzimas xilose redutase (mutada, prefere NADH), xilitol desidrogenase e xiluloquinase	93,9 g/L; 0,91g/g; 2,18 g/L/h	103 g/L xilose	(TAMAKAWA; IKUSHIMA; YOSHIDA, 2012)
<i>C. sonorensis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	Interrupção do gene da piruvato descarboxilase ( <i>pdca1/pdca2</i> )	~ 85 g/L		
<i>C. sonorensis</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	Interrupção do gene da piruvato descarboxilase ( <i>pdca1/pdca2</i> )	> 80 g/L	100 g/L glicose	(ILMÉN et al., 2013)
<i>C. sonorensis</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Interrupção do gene da piruvato descarboxilase ( <i>pdca1/pdca2</i> )	92 g/L		
<i>C. sonorensis</i>	<i>L. helveticus</i>	Duas cópias de <i>ldhL</i>	31 g/L	50 g/L xilose	(KOIVURANTA et al., 2014)
<i>C. glycerinogenes</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>LDH</i> expressa sob o comando do promotor <i>PCggmt1</i> induzível por pH	12,3 g/L	100 g/L glicose	(HOU et al., 2019)

(Continuação)

Organismo hospedeiro	LDH	Outras modificações	Produção; rendimento; produtividade	Fonte de carbono	Referência
<b>L-lactato</b>					
<b><i>Kluyveromyces</i></b>					
<i>K. marxianus</i>	<i>B. taurus</i>		6,5 g/L; 0,81 g/L/h		
<i>K. marxianus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		12,2 g/L; 1,53 g/L/h	50 g/L glicose	(LEE et al., 2017)
<i>K. marxianus</i>	<i>S. epidermidis</i>		16,1 g/L; 2,01 g/L/h		
<i>K. marxianus</i>	<i>S. epidermidis</i> e <i>L. acidophilus</i>	Coexpressão de duas LDHs	24 g/L; 0,48 g/g		
<i>K. marxianus</i> BY25571	<i>L. lactis</i>	Interrupção dos genes <i>pdh1</i> e dos genes <i>adh1-4</i>	22,6 g/L		
<i>K. marxianus</i> BY25571	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Interrupção dos genes <i>pdh1</i> e dos genes <i>adh1-4</i>	46,3 g/L	Glicose	(BAE et al., 2018)
<i>K. marxianus</i> BY25571	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Interrupção dos genes <i>pdh1</i> e dos genes <i>adh1-4</i>	46 g/L		
<i>K. marxianus</i> BY25571	<i>L. acidophilus</i>	Interrupção dos genes <i>pdh1</i> e dos genes <i>adh1-4</i>	42,5 g/L		
<i>K. marxianus</i> BY25571	<i>L. plantarum</i>	Interrupção dos genes <i>pdh1</i> , dos genes <i>adh1-4</i> , <i>cyb2</i>	130 g/L	230 g/L extrato de al-cachofra	
<i>K. marxianus</i> YKX001	<i>Homo sapiens</i>		> 30 g/L		
<i>K. marxianus</i> YKX001	<i>Bacillus subtilis</i>		> 30 g/L	80 g/L glicose e 20 g/L xilose	(KONG et al., 2019)
<i>K. marxianus</i> YKX001	<i>B. megaterium</i>		47,37 g/L; 0,5 g/g; 0,99 g/L/h		
<i>K. marxianus</i> YKX001	<i>L. lactis</i>		> 30 g/L		

(Continuação)

Organismo hospedeiro	LDH	Outras modificações	Produção; rendimento; produtividade	Fonte de carbono	Referência
<b>L-lactato</b>					
<i>K. marxianus</i> YKX001	<i>R. oryzae</i>		33,51 g/L		
<i>K. marxianus</i> YKX001	<i>Plasmodium falciparum</i>		50 g/L; 0,55 g/g; 1,04 g/L/h		(KONG et al., 2019)
<i>K. marxianus</i> YKX001	<i>P. falciparum</i> e <i>B. megaterium</i>	Interrupção de <i>ddl1</i> e expressão de <i>Jen1</i> de <i>S. cerevisiae</i> e superexpressão <i>KmPFK</i>	103 g/L	180 g/L hidrolisado de espiga de milho	
<b>Komagataella</b>					
<i>K. phaffii</i>	<i>B. taurus</i>		0,46 g/g; 0,348 g/L/h		
<i>K. phaffii</i>	<i>B. taurus</i>	Expressão de <i>Jen1p</i> de <i>S. cerevisiae</i>	0,47 g/g; 0,413 g/L/h	Batelada-alimentada com glicerol (6%)	(LIMA et al., 2016)
<i>K. phaffii</i>	<i>B. taurus</i>	Superexpressão do gene putativo <i>Jen1p</i>	0,673 g/g; 0,673 g/L/h		
<i>K. phaffii</i>	<i>B. taurus</i>	Interrupção de <i>pdc1</i>	~30 g/L; 0,646 g/g		(MELO et al., 2018)
<i>K. phaffii</i>	<i>B. taurus</i>	Interrupção de <i>pdc1</i> e <i>ardh</i>	0,855 g/g		(MELO et al., 2020)
<b>Saccharomyces</b>					
<i>S. cerevisiae</i> SP4	<i>Pediococcus sinensis</i> (3 cópias)	Interrupção dos genes <i>pdc1</i> , <i>cyb2</i> , <i>gpd1</i> , <i>nde1</i>	26,6 g/L; 0,34 g/g		
<i>S. cerevisiae</i> SP5	<i>P. sinensis</i> (4 cópias)	Interrupção dos genes <i>pdc1</i> , <i>cyb2</i> , <i>gpd1</i> , <i>trp1</i> , <i>nde1</i>	35,8 g/L; 0,46 g/g	80 g/L glicose	(LEE et al., 2015)
<i>S. cerevisiae</i> SP6	<i>P. sinensis</i> (4 cópias)	Interrupção dos genes <i>pdc1</i> , <i>cyb2</i> , <i>gpd1</i> , <i>trp1</i> , <i>nde1/nde2</i>	36,4 g/L; 0,46 g/g		
<i>S. cerevisiae</i> SP7	<i>P. sinensis</i> (5 cópias)	Interrupção dos genes <i>pdc1</i> , <i>cyb2</i> , <i>gpd1</i> , <i>trp1</i> , <i>nde1/nde2</i>	37,8 g/L; 0,48 g/g		
<i>S. cerevisiae</i>	<i>R. oryzae</i>	Integração dos genes <i>cdt-1</i> , <i>gh1-1</i> , <i>XYL1</i> , <i>XYL2</i> , <i>XYL3</i>	83 g/L; 0,66 g/g	40 g/L xilose e 80 g/L celobiose	(TURNER et al., 2016)

(Continuação)

Organismo hospedeiro	LDH	Outras modificações	Produção; rendimento; produtividade	Fonte de carbono	Referência
<b>L-lactato</b>					
<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. taurus</i> e <i>P. sinensis japonica</i>	Interrupção de <i>pdc1</i> , <i>cyb2</i> , <i>gpd1</i> , <i>adh1</i> , <i>adh2</i> . Expressão do gene da acetadeído desidrogenase de <i>E. coli</i> ( <i>mhpF</i> e <i>eutE</i> )	36 g/L; 0,90 g/g	40 g/L glicose	(SONG et al., 2016)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. taurus</i> e <i>P. sinensis japonica</i>	Interrupção de <i>pdc1</i> , <i>cyb2</i> , <i>gpd1</i> , <i>adh1</i> , <i>adh2</i> , <i>adh6</i> . Expressão do gene da acetadeído desidrogenase de <i>E. coli</i> ( <i>mhpF</i> e <i>eutE</i> )	27 g/L; 0,93 g/g	29 g/L glicose	
<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. falciparum</i>	Integração dos genes <i>XR</i> , <i>XDH</i> e <i>XK</i> . Interrupção de <i>pdc1</i> e <i>pdc5</i>	0,67 g/g; 0,05 g/L/h	50 g/L glicose	(NOVY et al., 2017)
<i>S. cerevisiae</i> SR8LDH	<i>L. acidophilus</i>	Cepa otimizada para consumo de xilose (SR8) expressa a <i>LDH</i>	11,2 g/L	Hidrolisado ácido de resíduo de café	(KIM et al., 2019a)
<i>S. cerevisiae</i> BK01	<i>L. acidophilus</i>	Cepa SR8LDH evoluída em laboratório para tolerância a ácidos orgânicos (8% LA)	119 g/L (sem adição de agentes neutralizantes)	20 g/L glicose	(JANG et al., 2021)
<i>S. cerevisiae</i> NO.2-100	<i>L. casei</i> , <i>R. oryzae</i> e <i>B. taurus</i>	Deleção de <i>pdc1</i> e <i>adh1</i> . Expressão de ALD de <i>E. coli</i> e superexpressão de Jen1. Adaptação evolutiva a ácidos	121,5 g/L; 0,81 g/g; 1,69 g/L/h	Batelada alimentada glicose	(ZHU et al., 2022)
<b>D-lactato</b>					
<i>K. marxianus</i> BY25571	<i>L. plantarum</i>	Interrupção dos genes <i>pdc1</i> , dos genes <i>adh1-4</i> , <i>did1</i>	122 g/L	Extrato de alcachofra	(BAE et al., 2018)
<i>K. phaffii</i>	<i>L. mesenteroides</i>	4 cópias de <i>LDH</i>	3,48 g/L; 0,22 g/g; 36,3 mg/L/h	Metanol	(YAMADA et al., 2019)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>L. plantarum</i>	Interrupção de <i>pdc1</i> e adaptação evolutiva a acidez	154 g/L; 0,72 g/g; 4,16 g/L/h	Glicose	(PARK et al., 2018)

(Conclusão)

Organismo hospedeiro	LDH	Outras modificações	Produção; rendimento; produtividade	Fonte de carbono	Referência
<b>D-lactato</b>					
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Deleção de <i>pd1</i> , <i>adh1</i> , <i>gpd1/2</i> , <i>dld1</i> , <i>Jen1</i> . Superexpressão de <i>HAA1</i>	112 g/L; 0,80 g/g; 2,2 g/L/h	Glicose	(BAEK et al., 2016)
<i>S. cerevisiae</i> JHY5610	<i>L. mesenteroides</i>	Deleção de <i>adh1-5</i> , <i>gpd1/2</i> , <i>dld1</i> , <i>pd1</i> . Adaptação evolutiva a ácido láctico.	82,6 g/L; 0,83 g/g; 1,5 g/L/h	Glicose	(BAEK et al., 2017)
<i>S. cerevisiae</i> YIP-J-C-D-A1	<i>E. coli</i> (3 cópias) no sítio do transposon Ty1	Deleção de <i>pd1/6</i> , <i>adh1</i> , <i>dld1</i> , <i>cyb2</i> , <i>Jen1</i> .	80 g/L; 0,60 g/g; 1,1 g/L/h	Glicose	(ZHONG et al., 2019)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i> (3 cópias)	Cepa YIP-J-C-D-A1 e expressão de <i>loGAS1</i> de <i>Issatchenkia orientalis</i>	85,3 g/L; 0,71 g/g; 1,20 g/L/h	Glicose	(ZHONG et al., 2021)

Fonte: A autora (2023).

### 1.1.1 Fontes alternativas de carbono na produção de ácido lático por fermentação microbiana

A produção comercial de ácido lático é baseada na fermentação dos carboidratos provenientes majoritariamente de cana-de-açúcar, milho e mandioca (GRAND VIEW RESEARCH, INC., 2021). Porém, o manuseio destas matérias primas resulta na geração de resíduos agroindustriais como o bagaço da cana e a espiga de milho. Estes resíduos podem ser tratados através da hidrólise ácida e/ou enzimática para a liberação dos açúcares presentes na parede vegetal que podem ser utilizados para a fermentação microbiana. Este processo permite a fermentação a partir de resíduos pode ser denominada de segunda geração.

O uso de resíduos industriais para a produção de ácido lático, como a biomassa vegetal, pode reduzir o custo do substrato durante e o bioprocessamento e estimular a produção sustentável. Essa abordagem está alinhada com a Agenda 2030 dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas, como observado abaixo:

**12.5** Até 2030, reduzir substancialmente a geração de resíduos por meio da prevenção, redução, reciclagem e reuso; (...) **12.a** Apoiar países em desenvolvimento a fortalecer suas capacidades científicas e tecnológicas para mudar para padrões mais sustentáveis de produção e consumo. (ODS Agenda 2030, Objetivo 12, ONU).

Na Tabela 2 estão listados alguns exemplos de microrganismos geneticamente modificados que foram utilizados na produção de ácido lático a partir de fontes não convencionais nos últimos 10 anos.

**Tabela 2. Fonte de carbono alternativas utilizadas para a produção heteróloga de ácido lático.**

(Continua)

Substrato		Organismo	Produção/ rendimento	Referência
Matéria-prima	Concentração			
Amido (batata, trigo e milho)	100 g/L	<i>A. oryzae</i>	30 g/L	(WAKAI et al., 2014)
Celobiose e xilose	40 g/L xilose e 80 g/L celobiose	<i>S. cerevisiae</i>	83 g/L; 0,66 g/g	(TURNER et al., 2016)
Extrato de tubérculos de alcachofra	230 g/L	<i>K. marxianus</i> BY25571	130 g/L	(BAE et al., 2018)

(Conclusão)

Substrato		Organismo	Produção/ rendimento	Referência
Matéria-prima	Concentração			
Glicerol	Batelada-alimentada	<i>K. phaffii</i>	0,673 g/g	(LIMA et al., 2016)
Glicerol	80 g/L (Alimentação 40 g/L)	<i>K. phaffii</i>	~30 g/L; 0,646 g/g	(MELO et al., 2018)
Glicerol	Batelada-alimentada (6% glicerol)	<i>K. phaffii</i>	0,855 g/g	(MELO et al., 2020)
Glicerol bruto	60 g/L	<i>E. coli</i>	50,1 g/L	(MAZUMDAR et al., 2013)
Glicose e xilose	85 g/L glicose e 20 g/L xilose	<i>K. marxianus</i> YKX001	50 g/L; 0,55 g/g	(KONG et al., 2019)
Hidrolisado de espiga de milho	180 g/L	<i>K. marxianus</i> YKX001	103 g/L	
Hidrolisado ácido de resíduos de café	~ 0,77 g, glicose, 16 g xilose, galactose, manose	<i>S. cerevisiae</i> SR8	11,2 g/L	(KIM et al., 2019a)
Xilose	103,2 g/L	<i>C. utilis</i>	93,9 g/L; 0,91g/g	(TAMAKAWA; IKUSHIMA; YOSHIDA, 2012)
Xilose	100 g/L	<i>E. coli</i> SZ470	66 g/L	(ZHAO et al., 2013)
Xilose	50 g/L	<i>C. sonorensis</i>	31 g/L	(KOIVURANTA et al., 2014)
Xilose	50 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	0,8 g/g	(NOVY et al., 2017)

Fonte: A autora (2023).

#### 1.1.1.1 Glicerol bruto

No Brasil, além da extensa variedade de biomassa vegetal disponível, o glicerol ( $C_3H_8O_3$ ) é uma fonte de carbono que deve ser considerada para fins biotecnológicos por ser um subproduto da indústria do biodiesel. Como forma de estimular a utilização e produção de biocombustíveis no território nacional, a mistura destes ao diesel fóssil é obrigatória no percentual de 12,0% (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2023).

Uma das formas de produção de biodiesel é através da reação de transesterificação de triglicerídeos, que no Brasil são obtidos a partir de óleos vegetais, como óleo de soja e óleo de fritura usado; ou de gordura animal proveniente de frigoríficos (ANP, 2023). A reação de transesterificação ocorre entre triglicerídeos e álcool na presença de um catalisador, resultando na liberação de três moléculas de ácidos

graxos da quebra do triglicerídeo, que são transformados em ésteres de ácidos graxos, o biodiesel. Da quebra do triglicerídeo é formada uma molécula de glicerol. Desta maneira, aproximadamente 10% (massa/massa) do volume total da produção de biodiesel são referentes ao glicerol.

Porém, como mencionado acima, a reação requer a adição de álcool e catalisador, sendo comumente utilizados o metanol e o hidróxido de sódio, respectivamente. Assim, o glicerol recuperado ao final é denominado glicerol bruto por possuir contaminantes como o metanol, catalisador, sabão e outros, restringindo assim suas possibilidades de destino (KAUR et al., 2020).

Os processos de purificação para separar as impurezas do glicerol bruto, como destilação, resina de troca iônica, separação por membrana, acidificação seguida de neutralização e extração por solvente, podem não ser favoráveis comercialmente por apresentarem custo elevado (CHOL et al., 2018). Assim, o glicerol bruto tem se tornado uma matéria-prima de baixo valor comercial e rotas para sua conversão e valorização são relevantes (KAUR et al., 2020; KUMAR et al., 2021).

Em trabalho desenvolvido por Mazumdar e colaboradores, uma cepa de *E. coli* modificada para a produção de ácido láctico foi otimizada para a produção a partir de glicerol bruto atingindo o rendimento de conversão de 0,93 g/g ( $Y_{P/S}$ ). A cepa parental de *E. coli* utilizada possuía modificações para a atenuação da produção de succinato, acetato e etanol, além da superexpressão dos genes nativos *GlpK/D* e *GlpA* da via de metabolização de glicerol em aerobiose. Esta cepa foi então otimizada ao substituir a D-LDH nativa pelo gene L-LDH de *Streptococcus bovis* para a permitir a formação de apenas um isômero óptico, e bloquearam-se rotas adjacentes que resultavam na degradação de ácido láctico. Em um cultivo em frascos de meio mínimo com alimentação de glicerol bruto (40 g/L iniciais e 20 g/L adicionados após 48 h) a cepa otimizada consumiu 57,2 g/L de glicerol, resultando na produção de 50,1 g/L de ácido láctico de alta pureza óptica (99,9%) (MAZUMDAR et al., 2013). Até o presente momento este é o maior rendimento (0,93 g/g) relatado na produção de ácido láctico a partir de glicerol.

Segundo dados da ANP, em 2020 foram gerados 580,1 mil m<sup>3</sup> de glicerol bruto como subproduto da produção de biodiesel (ANP, 2020). Porém, o glicerol bruto da indústria brasileira é contaminado com metanol, um álcool tóxico para a maioria dos microrganismos. Entretanto, existem bactérias e leveduras que possuem metabolismo

metilotrófico, ou seja, utilizam metanol como fonte de carbono, como a bactéria *Methylobacterium extorquens* e a levedura *Komagataella phaffii* (SINGH et al., 2022).

Em trabalho anterior publicado por nosso grupo de pesquisa, foram avaliadas 11 amostras de glicerol bruto provenientes da produção de biodiesel de óleo de soja. Neste estudo foi demonstrada a capacidade da levedura *K. phaffii* em utilizar esta matéria como fonte de carbono, mesmo quando na presença do contaminante hidróxido de sódio (ANASTÁCIO et al., 2014). Em conjunto, as habilidades em utilizar o glicerol bruto, bem como o metabolismo metilotrófico, tornam a *K. phaffii* uma plataforma microbiana relevante para o desenvolvimento de processos de valorização do glicerol produzido no país.

## 2 A LEVEDURA *KOMAGATAELLA PHAFFII*

A levedura *Pichia pastoris* foi reclassificada para o gênero *Komagataella*, no qual inicialmente foram descritas três espécies: *K. phaffii*, *K. pastoris* e *K. pseudopastoris* (KURTZMAN, 2009). *K. pastoris* e *K. phaffii* são mais estudadas e utilizadas nas aplicações biotecnológicas. As linhagens X-33 (prototrófica) e GS115 (*his4*, Invitrogen) pertencem à espécie *K. phaffii*. Esta espécie foi isolada de exsudatos de árvores, é aeróbica, não patogênica, haploide e com tempo de duplicação de aproximadamente 2-3 h (HEISTINGER; GASSER; MATTANOVICH, 2020).

Ao longo dos anos, *K. phaffii* tem sido modificada por engenharia genética principalmente para a expressão heteróloga de proteínas em escala de bancada e industrial, na produção de biofármacos e enzimas. Isto se deve ao fato de possuir características favoráveis para a expressão heteróloga de proteínas, como promotores fortes induzíveis ( $P_{AOX1}$ ) e constitutivos ( $P_{GAP}$ ), a alta capacidade de secreção, a capacidade de realizar modificações pós-traducionais, além de atingir alta densidade celular (AHMAD et al., 2014; HEISTINGER; GASSER; MATTANOVICH, 2020).

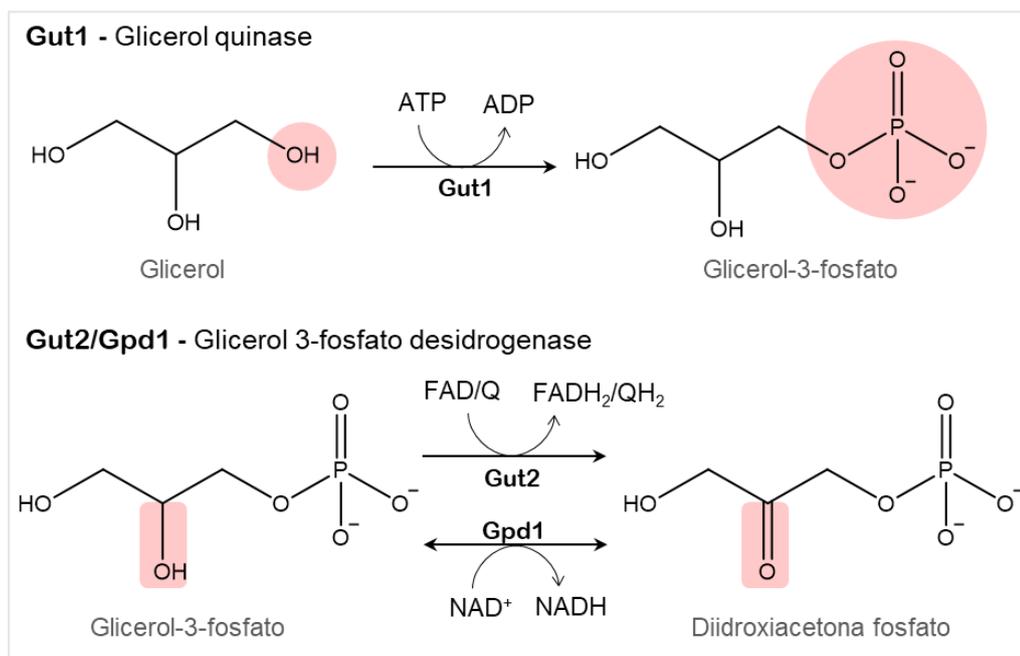
*K. phaffii* compõe o restrito grupo de leveduras metilotróficas, o que permite a utilização de metanol como fonte de carbono e energia. Outras fontes de carbono utilizadas por *K. phaffii* são: glicose, glicerol, etanol, trealose, L-ramnose, manitol, sorbitol, D-glucitol e os ácidos láctico, succínico, acético e cítrico (ATA et al., 2021; KURTZMAN, 2011).

Dada as características do metabolismo, bem como a disponibilidade de ferramentas de manipulação genética, *K. phaffii* pode ser favorável para a produção de químicos plataforma de interesse econômico. Além da produção de ácido láctico reportado pelo nosso grupo de pesquisa (LIMA et al., 2016; MELO et al., 2018, 2020), produtos de interesse comercial, como o ácido hialurônico de alto peso molecular (JEONG; SHIM; KIM, 2014), ácido xilônico (RAMOS et al., 2021), sesquiterpeno do óleo essencial de toranja (WRIESSNEGGER et al., 2014), álcoois e ésteres como isopentanol e acetato de isobutila (SIRIPONG et al., 2018, 2020) e licopeno (ZHANG et al., 2020b) já foram produzidos em cepas modificadas de *K. phaffii*.

## 2.1 METABOLISMO DE GLICEROL EM *K. PHAFFII*

A primeira etapa do metabolismo de glicerol consiste no seu transporte para o interior da célula através de proteínas canal ou de proteínas de transporte, como por exemplo, os simportadores. No genoma de *K. phaffii* foram descritos quatro genes putativos para simportadores de  $H^+$  e glicerol, enquanto que em outras leveduras, como *S. cerevisiae*, esta função depende da atividade do simportador Stl1. A presença destes transportadores contribui para uma melhor captação de glicerol em *K. phaffii* ( $q_{\text{glicerol}}$  0,37 g/g), aproximadamente oito vezes maior que a da levedura *S. cerevisiae* ( $q_{\text{glicerol}}$  0,046 g/g) (MATTANOVICH et al., 2009).

No citosol, apenas duas reações são necessárias para converter a molécula de glicerol em diidroxiacetona-fosfato (DHAP) (Figura 4). Na primeira reação, o glicerol é fosforilado em glicerol-3-fosfato (G3P) pela ação da enzima glicerol quinase (Gut1, EC: 2.7.1.30). Então, glicerol-3-fosfato é oxidado a DHAP pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase. Em *K. phaffii* estão anotadas a enzima mitocondrial Gut2 (EC: 1.1.5.3, Gene ID 8199784) e a enzima citosólica dependente de  $NAD^+/NADH$  (Gpd1, EC: 1.1.1.8, Gene ID 8199215) (KLEIN et al., 2017). A molécula de DHAP pode então ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato e seguir pelo metabolismo de glicose.



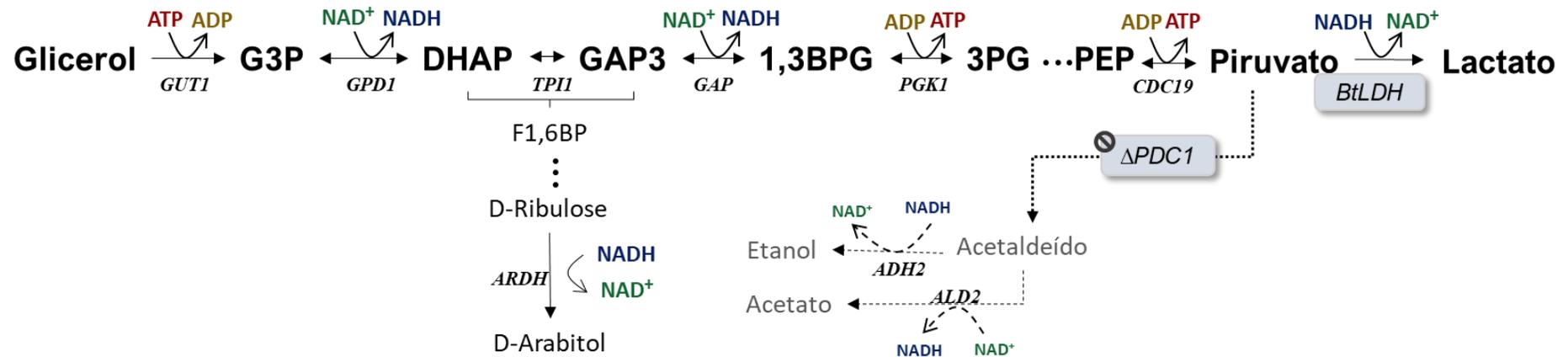
**Figura 4.** Reações enzimáticas que convertem glicerol a DHAP em *K. phaffii*

Fonte: A autora (2023).

## 2.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO EM *K. PHAFFII*

Viabilizar a produção de ácido láctico em leveduras pode parecer inicialmente um desafio de fácil resolução, visto que apenas pela expressão do gene codificante da enzima lactato-desidrogenase (LDH, EC: 1.1.1.27, Figura 5) é possível produzir o ácido láctico. A primeira cepa de *K. phaffii* modificada neste sentido, denominada XL, foi construída pela integração do gene da LDH de *Bos taurus* (*BtLDH*) sob o comando do promotor  $P_{GAP}$  na linhagem selvagem X-33. Em batelada alimentada utilizando glicerol como fonte de carbono, a cepa XL apresentou rendimento de 0,460 (g/g) na conversão de glicerol em ácido láctico ( $Y_{P/S}$ ), porém acetato e arabitol foram formados como coprodutos (LIMA et al., 2016).

A fim de reduzir a produção de acetato em *K. phaffii*, em trabalho seguinte foi realizada a interrupção da atividade da enzima piruvato descarboxilase (*Pdc1*, EC 4.1.1.1, Figura 5). A cepa resultante GLp (GS115:  $pGAP-BtLDH \Delta pdc1$ ) apresentou rendimento de 0,646 ( $Y_{P/S}$ ) em batelada-alimentada com 6% de glicerol. Porém, o aumento no rendimento foi acompanhado pelo aumento da produção de arabitol nas cepas *Pdc*-deficientes quando cultivadas em hipóxia (MELO et al., 2018).



**Figura 5. Via metabólica da produção de lactato a partir de glicerol em *K. phaffii* GLp**

Fonte: A autora (2023). A cepa GLp foi construída em trabalho anterior pela disrupção de *PDC1* e inserção da LDH bovina (genes modificados indicados em cinza) (MELO et al., 2018). Legenda: G3P, glicerol-3-fosfato; DHAP, diidroxiacetona-fosfato; GA3P, gliceraldeído-3-fosfato; 1,3BPG, 1,3-bifosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; F1,6BP, frutose-1,6-bifosfato; ATP: adenina trifosfato; ADP, adenina difosfato; NADH/NAD<sup>+</sup>, nicotinamida adenina dinucleotídeo. Genes: *GUT1*, glicerol quinase; *GPD1*, glicerol-3-fosfato desidrogenase; *TPI1*, triose-fosfato isomerase; *GAP*, gliceraldeído-3-fosfato; *PGK1*, fosfoglicerato quinase; *CDC19*, piruvato quinase; *ARDH*, arabitól desidrogenase; *ADH2*, álcool desidrogenase; *ALD2*, aldeído desidrogenase.

Ao se avaliar a reação global de glicerol à piruvato em *K. phaffii* em hipóxia (Figura 5), duas reações redox reduzem  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ , a da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (Gpd1) do metabolismo de glicerol e a da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAP3 a 1,3BPG) da fase de pagamento da glicólise. Um destes  $\text{NADH}$ s é reoxidado pela LDH, de modo que cada mol de glicerol rende um mol de ácido láctico, um de ATP e um de  $\text{NADH}$ .

Na ausência de Pdc1, em hipóxia esta molécula de  $\text{NADH}$  em excesso pode ser regenerada na produção de arabitol pela enzima arabitol desidrogenase (ARDH, EC: 1.1.1.250, Figura 5). Em trabalho seguinte realizado por Melo (2020), a interrupção do gene codificante da enzima arabitol desidrogenase não resultou em ganho no rendimento de ácido láctico quando comparada a cepa GLp em cultivo contínuo, mesmo que a produção de arabitol tenha sido reduzida. Portanto, a enzima ARDH atua para restabelecer o equilíbrio redox em hipóxia durante a fermentação de glicerol e sua interrupção pode explicar por que não houve melhora no rendimento (MELO et al., 2020).

Todas as cepas citadas anteriormente foram cultivadas em hipóxia para que o metabolismo fermentativo fosse priorizado em relação a respiração. Estudos sobre a fisiologia de *K. phaffii* sugerem que o fluxo da via metabólica de produção de arabitol aumenta à medida em que a concentração de oxigênio é reduzida no cultivo (21%, 11% e 8%), indicando que a produção de arabitol em *K. phaffii* pode ser considerada essencial para restaurar o equilíbrio redox (BAUMANN et al., 2010).

Neste trabalho, estratégias complementares que possibilitem a produção de ácido láctico na cepa GLp em aerobiose e sem a produção de uma molécula de  $\text{NADH}$  em excesso serão discutidas nos dois primeiros capítulos. No primeiro capítulo, avaliamos a interrupção da atividade de Gpd1 e estratégias complementares a fim de corrigir o desbalanço redox de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  da reação global para evitar o desvio para a formação de arabitol. Já no segundo capítulo, avaliamos a deleção do gene da subunidade 1 do transportador mitocondrial de piruvato (Mpc1) a fim de reduzir o desvio de piruvato para a respiração celular em aerobiose. Apesar de estarem apresentadas em capítulos separados, para fins de organização, as estratégias foram pensadas para atuarem de forma sinérgica. No terceiro capítulo, sugerimos a inserção de uma LDH mais ativa em conjunto com a superexpressão do transportador de monocarboxilatos identificado em trabalhos anteriores (LIMA et al., 2016).

## PRIMEIRO CAPÍTULO: DELEÇÃO DE *GPD1*

### 1 INTRODUÇÃO

A engenharia metabólica para otimização da biossíntese de produtos não-naturalmente produzidos por um microrganismo pode resultar em alterações no seu metabolismo, como por exemplo, o desbalanço redox. Os cofatores para reações redox, como por exemplo NADH, possuem um papel fundamental no acoplamento das reações catabólicas, anabólicas e na geração de energia. Portanto, as alterações no equilíbrio redox podem ser favoráveis ou deletérias à produção de metabólitos de interesse (LEE et al., 2015; LI et al., 2022).

A biossíntese de ácido láctico envolve o consumo de NADH (Figura 5). Contudo, a tentativa de regular o balanço de NADH/NAD<sup>+</sup> pela deleção dos genes que codificam NADH desidrogenase externas da mitocôndria que oxidam NADH citosólico, *NDE1* e *NDE2*, não resultou em uma melhor produção de ácido láctico em *S. cerevisiae*. A deleção da isoforma Nde1 na cepa de *S. cerevisiae* otimizada pela deleção prévia de *PDC1*, *CYB2* e *GPD1* resultou na diminuição da produção de ácido láctico em 24%, e consequentemente aumentou a produção de coprodutos como o etanol (LEE et al., 2015).

Em um estudo mais recente em *S. cerevisiae* demonstrou-se, ao contrário do proposto por Lee e colaboradores (2017), o consumo de NADH pode ser benéfico para o acúmulo de ácido láctico em cepas engenheiradas de *S. cerevisiae*. Neste estudo, foram expressas enzimas que oxidam NADH, como por exemplo o gene da enzima NADH oxidase de *S. pneumoniae*. Na cepa final a razão NADH/NAD<sup>+</sup> citosólica foi reduzida em relação a cepa parental, o que resultou em rendimento ( $Y_{P/S}$ ) de ácido láctico de 0,66 (g/g) em meio rico com glicose (LI et al., 2022).

Como apresentado anteriormente, a produção de ácido láctico em *K. phaffii* resulta numa molécula de NADH em excesso devido à ação das enzimas Gpd1 e GAPH que reduzem NAD<sup>+</sup> e na ausência de Pdc1, evitando que o metabolismo fermentativo reoxide o NADH excedente. Desta forma, a substituição da atividade de uma das reações que reduzem NAD<sup>+</sup> por uma reação alternativa que não utilize estes substratos poderia corrigir o desbalanço de cofatores NADH/NAD<sup>+</sup> e ser uma alternativa para a melhoria do rendimento deste bioprocessos em *K. phaffii*.

Em eucariotos, há uma segunda glicerol-3-fosfato desidrogenase (Gut2), uma enzima mitocondrial, localizada na face externa da membrana interna, logo com acesso aos substratos citosólicos, e que utiliza a ubiquinona (Q) como co-substrato (KLEIN et al., 2017). Esta enzima está anotada no genoma de *K. phaffii* (Gene ID: 8199784), e, portanto, a deleção de *GPD1* não interromperia a utilização de glicerol por completo. Todavia, a atividade catalítica de Gut2 pode não ser suficiente para manter a eficiência do processo de conversão de glicerol em ácido láctico em *K. phaffii*. Desta forma, o objetivo deste capítulo consiste na deleção de *GPD1* com a concomitante superexpressão do gene da enzima glicerol 3-fosfato oxidase (Gpo, EC 1.1.3.21) da bactéria aeróbica *Aerococcus viridans* (Figura 6). A enzima Gpo realiza a conversão de G3P em DHAP e utiliza o oxigênio ( $O_2$ ) como cofator, liberando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Figura 6). Apesar de *K. phaffii* possuir a enzima catalase, que realiza a degradação de  $H_2O_2$ , esta enzima encontra-se compartimentalizada no peroxissomo (POTAPOVICH et al., 2001). Assim, objetivou-se construir uma segunda linhagem para avaliar o impacto da expressão do gene da catalase citosólica de *Neurospora crassa* (*NcCAT1*) (SCHLIEBS et al., 2006) (Figura 6).



A inserção de Gpo, uma enzima da classe das oxidases ( $O_2$ ), requer que o processo seja conduzido em aerobiose. Porém, por ser uma levedura aeróbica, quando cultivada em aerobiose a produção de biomassa e a respiração celular serão priorizadas. Portanto, no capítulo 2 serão apresentadas duas estratégias complementares, a deleção de *MPC1* concomitante à expressão do gene de uma hemoglobina bacteriana (*vhb*) (Figura 6).

## 1.1 OBJETIVOS

- a) Interrupção de *GPD1* na linhagem de *K. phaffii* GLp pela integração de *GPO* de *Aerococcus viridans*, resultando na cepa GLp1;
- b) Interrupção de *GPD1* na linhagem GLp pela integração de *GPO* de *A. viridans* e o gene da catalase 1 de *Neurospora crassa*, resultando na cepa GLp2;
- c) Testar o método de reciclagem de marca de seleção pela contrasseleção induzida pelo promotor  $P_{LRA3}$ ;
- d) Avaliar o crescimento das cepas e a produção de ácido láctico nas cepas GLp1 e GLp2 cultivadas em batelada em aerobiose em biorreator de bancada.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CONSTRUÇÃO DE CEPAS

A metodologia utilizada na construção de cepas em *K. phaffii* foi similar nos três capítulos desta tese. Portanto, os métodos serão descritos em detalhes neste capítulo e, se necessário, complementados nos próximos.

#### 2.1.1 Material genético e cepas

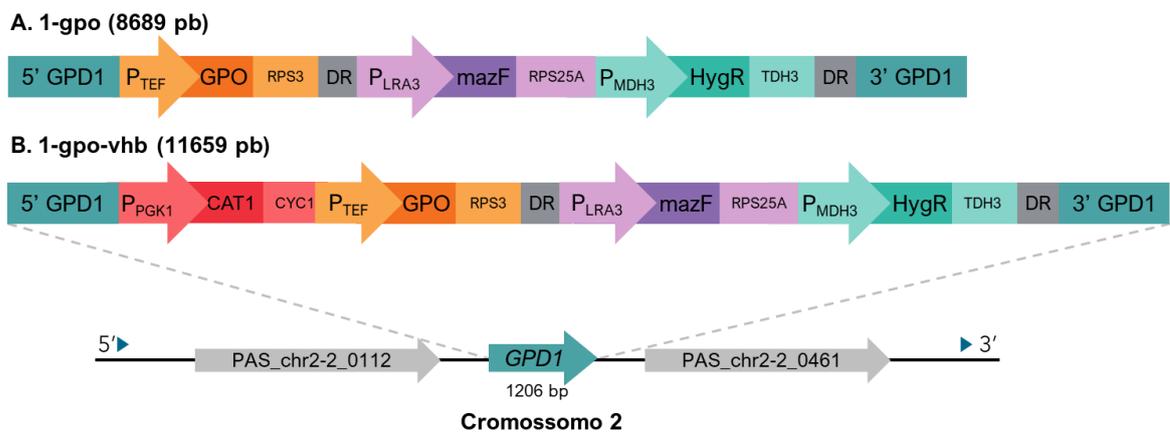
Dois cassetes foram concebidos para a deleção de *GPD1* (Gene ID 8199215) em *K. phaffii*, que diferem apenas na inclusão ou não do gene da catalase 1 (Figura 7). O gene da glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) de *Aerococcus viridans* foi inserido sob o controle do promotor  $P_{TEF1}$  de *S. cerevisiae*. Já no cassete que adicionalmente expressa a catalase, o gene responsável pela catalase de *N. crassa* (*NcCAT1*) foi inserido sob o promotor da 3-fosfoglicerato quinase ( $P_{PGK1}$ ) de *K. phaffii* (ARRUDA et al., 2016).

Ambos os cassetes possuem uma região destinada à seleção e contrasseleção de cepas. Os cassetes para seleção e contrasseleção foram flanqueados por regiões aleatórias em repetição direta, geradas computacionalmente (<https://faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm>; comprimento de 600 pb, conteúdo GC de 41%, idêntico ao do genoma da levedura; DR – *direct repeats*, Figura 7) para possibilitar a excisão por recombinação homóloga interna. O cassete de seleção expressa o gene da higromicina fosfotransferase (HygR) sob o promotor constitutivo da malato desidrogenase peroxissomal ( $P_{MDH3}$ ) de *K. phaffii* (PRIELHOFER et al., 2017). Como forma de contrasseleção, o gene *mazF* da endonuclease tóxica de *E. coli* foi inserido sob o comando do promotor da L-ramnonato desidratase ( $P_{LRA3}$ ) induzível por ramnose (LIU et al., 2016; JIAO et al., 2019). Portanto, quando cultivadas em ramnose, a expressão de MazF induzirá a morte celular em indivíduos que não tenham perdido os cassetes de seleção e contrasseleção por recombinação homóloga das regiões DR.

Por fim, para guiar a recombinação homóloga no *locus* para deleção de *GPD1* em *K. phaffii*, a região de homologia 5' *GPD1* tem início logo após o códon de parada da ORF a montante de *GPD1* (PAS\_chr2-2\_0112), e se estende até a metade do gene, com introdução de uma mutação no códon de iniciação para ATC a fim de

garantir que não haja tradução, resultando em um braço de homologia de 768 pb. A região 3' *GPD1* corresponde a parte da região terminal do gene e se estende além do códon de parada, terminando antes do códon de início da ORF a jusante (PAS\_chr2-2\_0461), para um tamanho final de 773 pb. Parte da região medial do gene é perdida pela introdução do cassete, garantido nocaute irreversível do gene.

Os cassetes foram sintetizados pela empresa GenScript (Piscataway, NJ, EUA).



**Figura 7. Cassetes para interrupção de *GPD1* em *K. phaffii***

Fonte: A autora (2023). As linhas tracejadas indicam os sítios de recombinação homóloga no cromossomo 2 de *K. phaffii*.

Os plasmídeos e cepas utilizados, bem como as cepas construídas neste capítulo, estão descritos à Tabela 3.

**Tabela 3. Plasmídeos e cepas utilizados para a deleção de *GPD1***

		(Continua)
<i>Plasmídeos</i>	<i>Utilização</i>	<i>Referência</i>
1-gpo	Interrupção do gene da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase ( <i>GPD1</i> ) pela inserção do gene da enzima glicerol-3-fosfato oxidase ( <i>GPO</i> ) de <i>Aerococcus viridans</i> sob o comando do promotor P <sub>TEF1</sub> de <i>S. cerevisiae</i> .	
2-gpo_cat	Interrupção do gene da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase ( <i>GPD1</i> ) pela inserção do gene da enzima glicerol-3-fosfato oxidase ( <i>GPO</i> ) de <i>Aerococcus viridans</i> sob o comando do promotor P <sub>TEF1</sub> de <i>S. cerevisiae</i> e adicionalmente a inserção do gene da catalase 1 de <i>Neurospora crassa</i> sob o promotor P <sub>PGK1</sub> nativo de <i>K. phaffii</i> .	Este trabalho

<b>Cepas</b>	<b>Genótipo</b>	(Conclusão) <b>Referência</b>
GLp	GS115: pGAP- <i>BtLDH</i> $\Delta$ pdc1 <i>HIS4</i>	MELO et al., 2018
GLp1	GLp: gpd1::gpo <i>Hyg<sup>R</sup></i>	
GLp2	GLp: gpd1::gpo NcCAT1 <i>Hyg<sup>R</sup></i>	
GLp1 <i>hyg-</i>	GLp: gpd1::gpo	Este trabalho
GLp2 <i>hyg-</i>	GLp: gpd1::gpo NcCAT1	

Fonte: A autora (2023).

### 2.1.2 Amplificação *in vitro* de plasmídeos

Os plasmídeos foram amplificados *in vitro* pela técnica de amplificação de círculo rolante, do inglês *rolling circle amplification* (RCA), adaptado do método descrito por Dean e colaboradores (DEAN et al., 2001) e no protocolo descrito pelo fornecedor dos reagentes (ThermoFisher Scientific). Inicialmente, o DNA foi desnaturado em solução de volume final de 5  $\mu$ L contendo 1X tampão da enzima EquiPhi 29, 100  $\mu$ M de hexanucleotídeos iniciadores aleatórios resistentes a exonucleases e 1 ng de plasmídeo. A solução foi incubada a 95 °C por 3 min e imediatamente colocada no gelo. Para a reação de amplificação, uma solução foi preparada contendo 1X de tampão EquiPhi, 1 mM de DTT, 2,5 mM de dNTP, 0,02 U de pirofosfatase, 0,5 U da DNA polimerase EquiPhi29 e água MilliQ q.s.p. 20  $\mu$ L. Os volumes utilizados para ambas as reações estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4. Composição das soluções de desnaturação e amplificação utilizadas no RCA**

<b>Solução de desnaturação do plasmídeo</b>		<b>Solução para amplificação</b>	
Reagente	Volume ( $\mu$ L)	Reagente	Volume ( $\mu$ L)
1X EquiPhi Buffer	0,5	1X EquiPhi Buffer	1,5
Primer randômico	1	DTT	0,2
Plasmídeo	0,5	dNTP	0,8
Água	3	Pirofosfatase	0,2
		EquiPhi29 DNA polimerase	1
		Água deionizada	11,3
		Solução de desnaturação	5
Volume total	5	Volume total	20

A solução para amplificação foi incubada em termociclador por de 3 h a 45 °C para extensão dos concatêmeros, seguido por um período de 10 min a 65 °C para inativação da polimerase. Uma alíquota de 0,5  $\mu$ L foi utilizada para verificação em gel de 0,8% agarose. Para uso na transformação de cepas de *K. phaffii*, o produto da

amplificação foi diluído cinco vezes com água ultrapura e tratado com endonucleases descritas no APÊNDICE 1.

### 2.1.3 Precipitação de DNA

Adicionaram-se 10% (v/v) de solução 5 M de acetato de amônio à solução contendo o DNA e homogeneizou-se a amostra gentilmente. Adicionou-se um volume (v/v) de isopropanol à mistura e incubou-se a -20 °C por período de aproximadamente 8 h. Após a incubação para precipitação, as amostras foram centrifugadas a 12000×g 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado, lavado duas vezes por centrifugação em etanol a 70% gelado. Após a remoção completa do etanol, o DNA foi ressuscitado em água deionizada.

### 2.1.4 Eletroporação de *K. phaffii*

O protocolo utilizado para preparo das cepas de *K. phaffii* eletrocompetentes e transformação foi adaptado de Wu e Letchworth (WU; LETCHWORTH, 2004). O estoque da levedura armazenado a -80 °C foi reativado em meio YPD ágar (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose e 1,5% ágar), suplementado com 0,1 mg/mL zeocina quando necessário, e incubada a 30 °C até o aparecimento de colônias. Para o pré-inóculo, uma colônia fresca foi inoculada em 25 mL de meio YPD em frasco aletado (250 mL) e incubada por período aproximado de 12 h a 30 °C e agitação de 200 rpm. No dia seguinte, uma alíquota do pré-inóculo foi coletada para inocular 100 mL de meio YPD em frasco Erlenmeyer aletado (1000 mL). O volume de pré-inóculo utilizado foi calculado de maneira que resultasse em uma OD<sub>600</sub> inicial entre 0,5 e 0,7 de acordo com a equação (1).

$$(1) \quad OD_{\text{pré-inóculo}} \times v_{\text{pré-inóculo}} = OD_{0,5-0,7} \times 100 \text{ mL}$$

A cultura foi mantida a 30 °C sob agitação de 200 rpm até que atingisse a OD<sub>600</sub> entre 1,15 e 1,3, e nunca superior a 1,5. Ao atingir a OD<sub>600</sub> desejada, a cultura foi dividida em dois tubos cônicos de 50 mL e centrifugada a 2000×g por 5 min. O meio de cultivo foi removido e o sedimento, ressuscitado em 8 mL de solução para transformação preparada no momento da transformação, composta por 10 mM DTT,

10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM LiAc e 0,6 M sorbitol. Ao se ressuspenderem as células nesta solução, o volume total foi transferido para um único tubo cônico e incubado por 30 min à temperatura ambiente. Após este período, as células foram coletadas novamente por centrifugação a 2000xg, 4 °C por 5 min. A solução foi removida e as células, lavadas gentilmente com solução 1 M sorbitol gelado e centrifugação, por 3 vezes, com ressuspensão em volumes decrescentes (25, 10 e 5 mL). Após a última lavagem, as células foram finalmente ressuspensas em 200 µL de 1M sorbitol gelado e mantidas em gelo até o uso.

Aproximadamente 80~90 µL de células eletrocompetentes foram misturadas a 10 µg de DNA linearizado ressuspendido em >10 µL de água. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 2 mm e incubada em gelo por 5 min. O choque elétrico foi aplicado com os parâmetros de 1,5 kV, 25 µF e 200 Ω (Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems, Bio-Rad). Imediatamente após o choque, adicionou-se 1 mL de 1M sorbitol e as células foram transferidas para tubo estéril de 2 mL e incubadas a 30 °C por 1 h sem agitação. Após este período, adicionou-se 1 mL de YPD e as células foram incubadas por mais 2 h. Alíquotas de 100 a 200 µL foram plaqueadas em YPD ágar contendo a marca de seleção adequada (0,1 mg/mL de zeocina ou 0,2 mg/mL higromicina). Adicionalmente, o volume restante da solução de células transformadas foi centrifugado, ressuspendido em 100 µL e plaqueado em YPD com agente de seleção. Em algumas transformações as placas de seleção foram preparadas com indicadores de pH que pudessem sinalizar a liberação de ácidos (APÊNDICE 5). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C até o aparecimento de colônias.

### **2.1.5 PCR de colônia**

A seleção inicial de clones foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um fragmento de colônia como fonte do DNA molde. Para isso, uma colônia fresca foi coletada com o auxílio de um palito estéril e suspensa em 10 µL de solução 20 mM de NaOH filtrado. A solução foi aquecida a 95 °C por 5 min seguidos por breve agitação em vórtex. Um microlitro foi utilizado na reação de amplificação (reação em cadeia da polimerase, PCR).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho estão descritos no APÊNDICE 2. A solução de volume final de 20 µL foi composta por 1X de Tampão de

DNA polimerase com 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 mg/mL de BSA, 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase e de 200 ng a 1 µg de DNA molde. As condições programadas no termociclador foram de 95 °C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de amplificação (95 °C/1 min, 55–61 °C/30 s, 72 °C/1 min) e extensão final a 72 °C por 10 min.

### **2.1.6 Extração de DNA genômico de leveduras**

O protocolo para extração do DNA genômico de leveduras foi adaptado do método *Bust'n'Grab* (HARJU; FEDOSYUK; PETERSON, 2004). Uma colônia fresca foi inoculada em 10 mL de meio YPD e cultivada a 30 °C e 200 rpm. Após o crescimento, coletou-se 1,5 mL de cultura em um tubo de 2 mL, que foi submetido à centrifugação por 5 min em velocidade máxima. O meio de cultivo foi descartado e o sedimento, ressuspendido em 200 µL de tampão de lise (2% de Triton X-100, 1% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 8, 1 mM de EDTA, pH 8) e agitado em vórtex. Para o choque térmico, o tubo foi incubado por 2 min no congelador a -80 °C, seguidos de 1 min a 95 °C no banho-seco e agitação por 30 s no vórtex. Este processo foi repetido por 3 vezes. Em seguida, 200 µL de fenol-clorofórmio (1:1) foram adicionados e a suspensão, homogeneizada por agitação em vórtex durante 1 min. Centrifugou-se então o tubo à temperatura ambiente e velocidade máxima por 3 min. Após a centrifugação, a fase superior translúcida foi coletada (aproximadamente 200 µL) e transferida para um novo tubo (1,5 mL) contendo 400 µL de 100% etanol gelado. Incubou-se a solução em refrigerador a -20 °C por pelo menos 8 h. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 20000xg e 4 °C por 30 min. Após a remoção da solução, o DNA precipitado foi lavado por 3 vezes por centrifugação em volumes de 700 µL de etanol gelado a 70%. Após a remoção de todo o etanol da última lavagem, o DNA genômico (DNAg) foi ressuspendido em água deionizada (<50 µL) e quantificado por espectrofotometria (NanoDrop One<sup>C</sup>, Thermo Fisher Scientific).

### **2.1.7 Preservação de leveduras em glicerol**

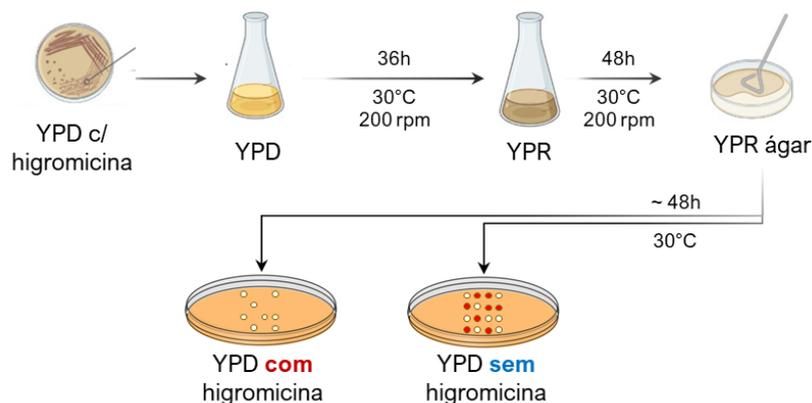
Clones foram preservados em solução de glicerol a 20% (v/v). Uma colônia foi inoculada em 10 mL de YPD seletivo, que foram incubados a 30 °C e 200 rpm por até 24h. Após o crescimento, alíquotas de 1500 µL foram misturadas a 500 µL de

solução de glicerol a 80% (v/v) e armazenadas em criotubos (2 mL) em congelador a -80 °C.

### 2.1.8 Reciclagem da marca de seleção

Com o objetivo em viabilizar a reutilização de uma mesma marca de seleção na construção de cepas em *K. phaffii*, o cassete de resistência foi flanqueado por regiões idênticas em repetição direta (DR, *direct repeats*) para guiar a expulsão por recombinação homóloga interna desta região. A contrasseleção de clones baseou-se na indução do promotor  $P_{LRA3}$  em ramnose, comandando a endorribonuclease MazF.

Assim, uma colônia de um clone previamente validado foi inoculada em 50 mL de meio líquido YPD e cultivada por 36 h a 30 °C e 200 rpm. Após o crescimento celular, uma alíquota de 1 mL foi retirada e inoculada em 50 mL de meio líquido rico contendo ramnose como fonte de carbono (YPR, 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% ramnose). Após o crescimento celular (48 h, 30 °C, 200 rpm), alíquotas da cultura foram diluídas em água destilada esterilizada (1:2) e plaqueadas por espalhamento em placas de YPR ágar, que foram incubadas em estufa a 30 °C até o aparecimento de colônias. Aproximadamente 50 colônias isoladas das placas de YPR foram repicadas simultaneamente para placas de YPD ágar com e sem a adição de higromicina (0,2 mg/mL), que foram incubadas a 30 °C. Os clones que cresceram apenas na placa sem higromicina (Figura 8) foram coletados e investigados por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos apropriados. Os clones que cresceram na placa com higromicina foram descartados.



**Figura 8. Esquema demonstrando o processo de contrasseleção para a reciclagem de marca de resistência a higromicina.**

Fonte: A autora (2023). Ícones provenientes do software Biorender. As colônias em vermelho ilustram os clones selecionados que cresceram apenas na ausência de higromicina.

## 2.2 CULTIVO DE CEPAS E QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS

### 2.2.1 Batelada em meio UAB com 6% de glicerol

Para a avaliação do crescimento e da produção de metabólitos, as cepas GLp1 e GLp2 foram testadas em cultivo em batelada seguindo os parâmetros de cultivo definidos previamente para a cepa GLp (MELO et al., 2020). Para o cultivo em biorreator, as cepas foram reativadas em YPD ágar com zeocina (0,1 mg/mL) e incubadas em estufa a 30 °C. Para preparar o meio UAB, foram pesados (g/L): 0,02 g de cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,9 g de cloreto de potássio (KCl), 1,8 g de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) e 12,4 g de fosfato de amônio bibásico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ), todos dissolvidos em água. Após a dissolução dos componentes e adição do glicerol, o pH foi ajustado para 5,0 com solução HCl a 3 M. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 min.

Após o resfriamento do meio, adicionaram-se 4,35 mL (volume referente a 1L de UAB) de solução de elementos traço (PTM1). Para o preparo de PTM1 são dissolvidos 6,0 g de sulfato cúprico penta-hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 0,08 g de iodeto de sódio (KI), 3,0 g de sulfato de manganês mono-hidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), 0,2 g de molibdato de sódio di-hidratado ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0,02 g de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 0,5 g de cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), 20,0 g de cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ), 65,0 g de sulfato ferroso hepta-hidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,2 g de biotina e 5,0 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) até um volume final de 1 L de água. A solução foi esterilizada por filtração.

Para o preparo do pré-inóculo, uma colônia fresca foi inoculada em 100 mL de meio UAB em frasco Erlenmeyer aletado (1 L) e incubada a 30 °C e 200 rpm. Desta cultura, foi retirado um volume suficiente para o inóculo em biorreator, de forma que a  $\text{OD}_{600}$  inicial fosse aproximadamente 0,2 em de meio UAB. Duas dornas do biorreator New Brunswick® Bioflo 115 (Eppendorf) foram utilizadas, de 1,3 L e 3 L, nas quais os volumes máximos utilizados foram de 650 mL e 1 L, respectivamente. As condições foram mantidas a 30 °C, 2 vvm e pH 5,0 tamponado com água de amônia a 3 M. A agitação foi ativada por cascata para manter a taxa de oxigênio dissolvido em 50% e garantir que o processo ocorresse em aerobiose.

### 2.2.2 Consumo de substrato e quantificação de metabólitos

As amostras coletadas dos cultivos foram centrifugadas a 12.100×g por 5 min em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi diluído cinco vezes e filtrado usando um filtro de 0,22 µm em frascos de 1,5 mL próprios para análise de HPLC.

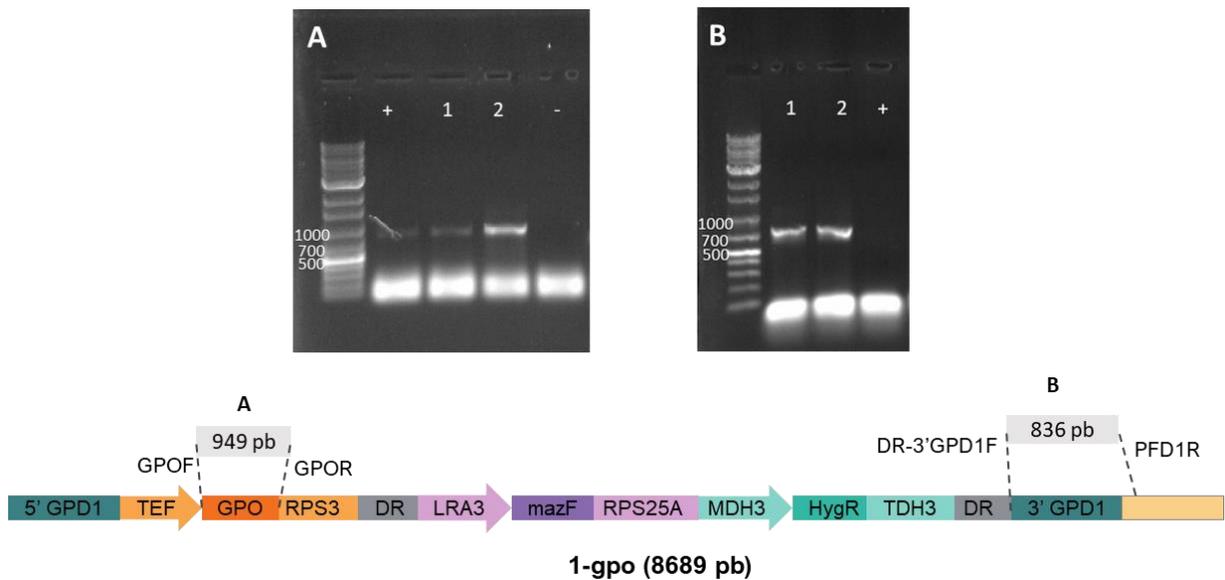
A quantificação seguiu o método descrito em trabalhos anteriores (LIMA et al., 2016; MELO et al., 2018; 2020). A coluna de exclusão iônica Rezex ROA para ácidos orgânicos H<sup>+</sup> 8% de estireno-divinilbenzeno sulfonado reticulado (SDVB) (300 × 7,8 mm, 00H-0138-K0, Phenomenex) equipada com a pré-coluna *Security Guard Cartridge Kit* (50 mm × 4 mm, KJ0-4282, Phenomenex) foi usada como fase estacionária para as análises em HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão). Uma solução de 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi usada como fase móvel em modo isocrático a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min a 60 °C. As concentrações de lactato, acetato e piruvato foram medidas pelo detector UV/VIS a 210 nm (SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japão), e as concentrações de glicerol, arabitol e etanol foram medidas no detector de índice de refração (RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japão). Curvas de calibração com seis concentrações decrescentes foram feitas para a quantificação dos compostos analisados. As amostras foram analisadas usando o software Lab Solutions, versão 5.54 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES E CONFIRMAÇÃO DE CEPAS

A construção de linhagens teve início com a transformação da cepa GLp utilizando o cassete 1-gpo (Figura 7) a fim de gerar a cepa GLp1. Apenas duas colônias foram recuperadas da placa de transformação a qual a cultura concentrada foi plaqueada. Não houve crescimento nas placas em que foram plaqueados 100 µL de cultura. Contudo, é importante ressaltar que nesta primeira transformação, o método utilizado para preparar as células eletrocompetentes foi adaptado de Scorer et al. 1994 (SCORER et al., 1994), em que as células são lavadas em solução de sorbitol a 1 M. Além disso, a preparação do plasmídeo utilizado foi proveniente de transformação bacteriana convencional e não por reação de RCA. Após verificar os desafios na obtenção de clones transformados de *K. phaffii*, o método de Wu e Letchworth (2004), que envolve o pré-tratamento das células com acetato de lítio e DDT, passou a ser utilizado. Além disso, o material genético passou a ser amplificado por RCA, resultando em concentrações elevadas (>10 µg) de material genético para as transformações.

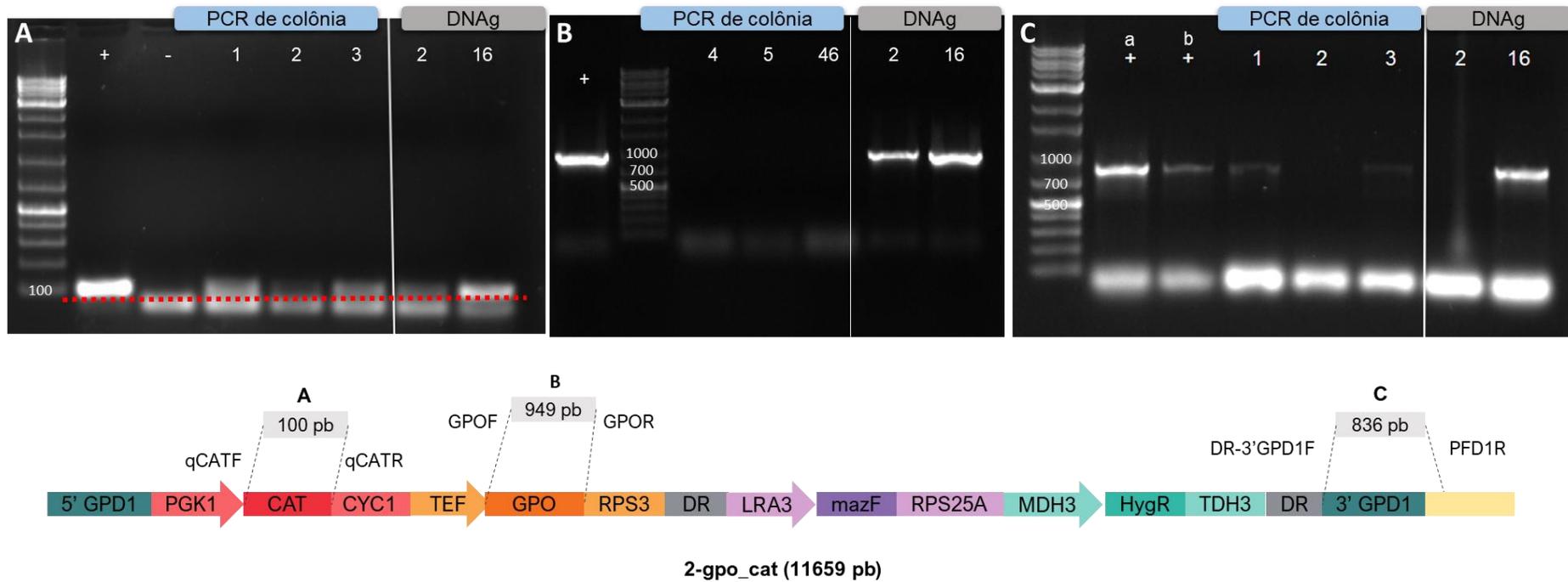
Porém, dois clones da primeira transformação tiveram o DNAG extraído para confirmação por PCR (Figura 9). Na Figura 9 A, é possível observar a amplificação de 949 pb resultante da reação com os oligos GPOF e GPOR que se anelam no gene *GPO* presente no cassete. Nesta reação, o plasmídeo foi utilizado como controle positivo e o DNA genômico da levedura não transformada, como controle negativo. Na segunda reação, os oligos DR-3'GPD1F e PFD1R foram utilizados para a confirmação da integração no *locus*. O oligo DR-3'GPD1F se anela em uma região sintética localizada entre o final da sequência DR e o início da região 3'GPD1. Esta região não é nativa do genoma de *K. phaffii*. Já o oligo PFD1R se anela na região a montante do *locus* no DNA nativo. Assim, a amplificação ocorrerá apenas nos casos em que houver integração no *locus* do gene *GPD1* (Figura 9, B) e, portanto, o DNAG da levedura não transformada foi usado como controle negativo da reação. Desta forma, os dois clones recuperados foram confirmados e cultivados para criopreservação em glicerol (20%) a -80 °C.



**Figura 9. Confirmação da construção da cepa GLp1**

Legenda: **A.** Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação de 949 pb de *GPO*. Controles: (+) plasmídeo, (-) DNAg cepa parental. **B.** Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação de 836 pb que confirma a integração do cassete no *locus* de *GPD1*. Controle positivo: DNAg cepa parental. Marcador: 1 kb ladder plus (M1191) Sinapse Biotecnologia.

A cepa GLp2 possui modificações similares às da cepa GLp1, diferenciando-se apenas pela adição do gene da catalase de *N. crassa* sob o comando do promotor  $P_{PGK1}$  nativo de *K. phaffii*. Os oligos qCAT1F e qCAT1R, inicialmente idealizados para qPCR, foram utilizados para a amplificação de 100 pb do gene *NcCAT1* (Figura 10, A). Apesar da banda inespecífica presente na parte inferior do gel, que pode ser resultado da formação dímeros de oligos ou do excesso de reagentes da reação, é possível diferenciá-la do amplicon de 100 pb ao se comparar o perfil eletroforético com os controles positivo (plasmídeo) e negativo (DNAg da cepa parental), como destacado na Figura 10. A partir da otimização do método de transformação, como citado acima, aproximadamente 60 colônias foram repicadas da placa de transformação para nova placa de YPD ágar, da qual clones foram selecionados aleatoriamente para a PCR de colônia. Outros clones, além de passar pela PCR de colônia, tiveram seu DNAg extraído para fins de comparação. À Figura 10 estão apresentados três géis de agarose referentes às rodadas de reações para confirmação da presença dos cassetes introduzidos. Em cada gel foram aplicadas amostras provenientes de PCR de colônia e de DNAg.



### Figura 10. Confirmação da cepa GLp2

Legenda: **A.** Gel de agarose (0,8%) mostrando a amplificação de *NcCAT1*. Controle positivo: plasmídeo. Controle negativo: DNAg da cepa não transformada. A linha tracejada em vermelho separa a amplificação de 100 pb da região de dímeros. **B.** Gel de agarose (1%) que confirma a amplificação de *GPO*. Nesta reação só ocorreu amplificação de amostras de DNAg. Controle positivo: DNAg de GLp1. **C.** Gel de agarose (1%) que confirma a integração do cassete no locus de *GPD1*. Controles positivos: (a) DNAg de GLp1; (b) PCR de colônia de GLp1. O rastro pode indicar degradação do DNAg do transformante 2. Marcador: 1 kb ladder plus (M1191) Sinapse Biotecnologia.

Dentre as 60 colônias repicadas, 26 foram avaliadas. Os transformantes 1, 3 e 16 amplificaram fragmentos que confirmaram o genótipo da cepa GLp2 (Figura 10). Contudo, é importante ressaltar que o método de PCR de colônia pode não ser reproduzível.

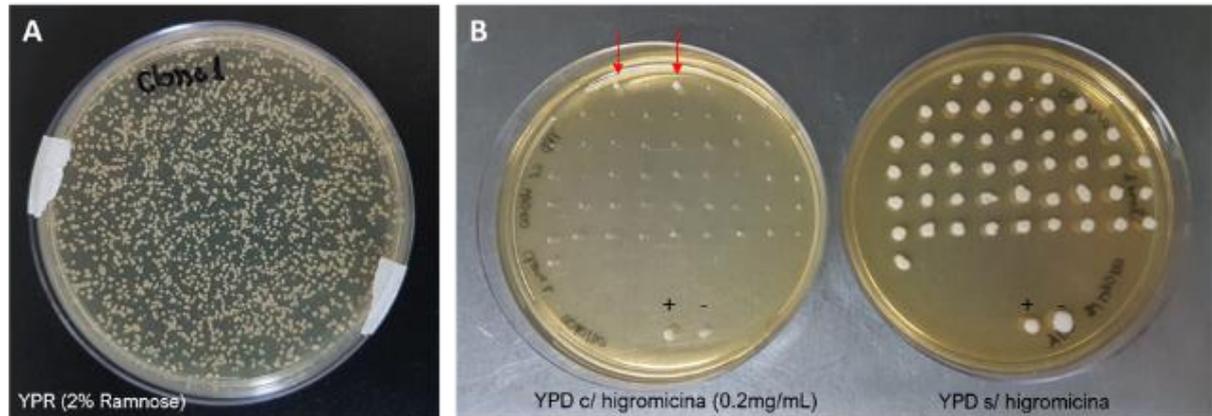
Ao todo, quatro métodos de PCR de colônia de leveduras foram testados durante a confirmação de cepas de *K. phaffii* neste trabalho, e o método descrito aqui foi escolhido por apresentar eficácia (Figura 10C – transformantes 1 e 3), ser rápido, simples, além de não requerer o uso de enzimas líticas (por exemplo, liticase). Porém, deve-se levar em conta que resultados de falso negativo podem ocorrer, e, portanto, a utilização de um controle positivo nestes casos se faz essencial. O transformante 16 foi selecionado e cultivado para criopreservação em glicerol (20%) a -80 °C.

### 3.1.1 Reciclagem da marca de seleção

Após a confirmação de transformantes de GLp1 e GLp2, ambas as linhagens foram submetidas ao processo de reciclagem da marca de seleção. As regiões de seleção e contrasseleção dos cassetes usados para gerar GLp1 e GLp2 são iguais, e, portanto, a confirmação por PCR se deu da mesma maneira. Um clone confirmado de GLp1 foi cultivado durante 36 h em YPD. Neste período, espera-se que alguns indivíduos percam o cassete de seleção e contrasseleção pelo processo de recombinação homóloga, que ocorre estocasticamente.

Uma alíquota foi passada para meio YPR, contendo 2% de ramnose, e incubada por um período maior, visto que *K. phaffii* apresenta crescimento mais lento em ramnose comparado ao crescimento em glicose (LIU et al., 2016). Esta cultura foi plaqueada por espalhamento em YPR ágar (Figura 11A) e, após o crescimento, 46 colônias isoladas foram repicadas simultaneamente em placas com YPD com e sem a adição de higromicina (0,2 mg/mL) e incubadas por 72 h (Figura 11B) O transformante original, resistente à higromicina, foi plaqueado como controle positivo e a cepa GLp, como controle negativo.

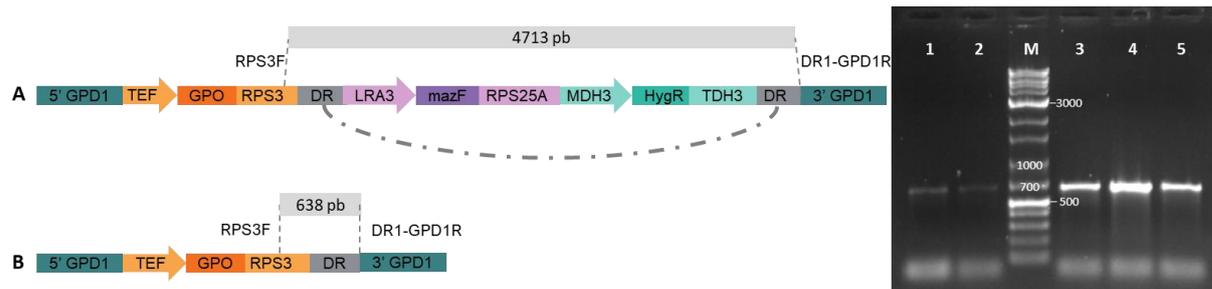
Os clones que apresentaram crescimento na placa contendo higromicina, como indicado pelas setas em vermelho na Figura 11B, foram descartados. Cinco clones foram selecionados da placa sem higromicina para confirmar a excisão da marca de seleção por PCR.



**Figura 11.** Placas de cultivos em meio contendo 2% ramnose (A) e 2% glicose (B) para a contra-seleção de clones para reciclagem da marca *Hyg<sup>R</sup>*.

Na reação de confirmação de PCR foram utilizados os oligos RPS3F e DR1-GPD1R, que se anelam ao terminador *RPS3tt* do cassete de *GPO* e ao final do cassete, entre a segunda região DR e o braço de homologia 3' *GPD1*, respectivamente (Figura 12A). Caso a marca de seleção tenha sido removida, como esperado pela seleção em ramnose, a amplificação irá gerar um amplicon de 638 pb (Figura 12B).

Os cinco clones selecionados randomicamente apresentaram amplificação de 638 pb. Além disso, as confirmações de *GPO* e interrupção de *GPD1* foram repetidas após a excisão. Os clones selecionados criopreservados em glicerol (20%) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O mesmo procedimento foi repetido para clones GLp2.



**Figura 12.** Confirmação da reciclagem da marca de resistência em GLp1

Legenda: Cassete 1-gpo antes (A) e após (B) a reciclagem de marca. Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação de 638 pb nos clones 1-5. Marcador: 1 kb ladder plus (M1191) Sinapse Biotecnologia.

A reciclagem da marca de seleção foi importante para viabilizar múltiplas modificações durante o processo de engenharia genética de cepas. As marcas de seleção que conferem resistência a drogas são classificadas como dominantes, que em *K. phaffii* são limitadas aos genes de resistência à geneticina-G418 (*Tn903kan*),

zeocina (*Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*), higromicina B (*hph* de *Klebsiella pneumoniae*), blasticidina S (blasticidina S-desaminase de *Aspergillus terreus*) e nourseotricina (nourseotricina acetil-transferase de *Streptomyces noursei*) (LIN-CE-REGHINO et al., 2008; YANG et al., 2014). Em contrapartida, a expressão de diversos genes de resistência pode resultar em uma sobrecarga da fisiologia de leveduras, além de apresentar o risco de contaminação ambiental (PIVA, 2015).

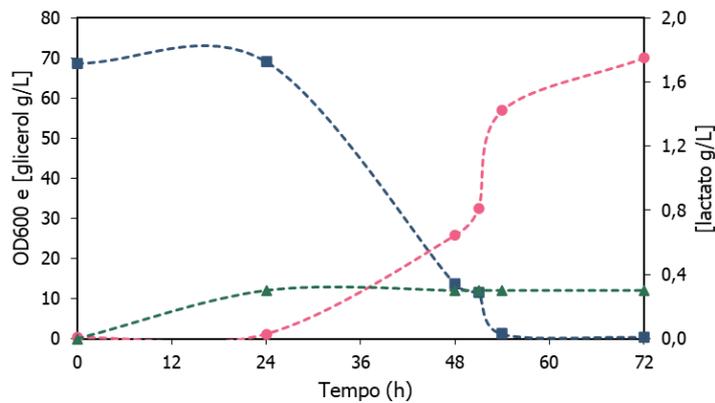
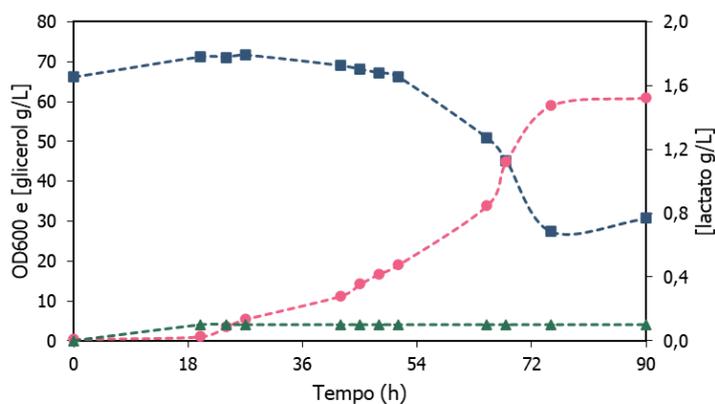
As técnicas desenvolvidas para a reciclagem de marcas de seleção em leveduras são baseadas na expressão de enzimas recombinases, como Cre-loxP ou FLP-FRT, ou na utilização de repetições diretas que possam guiar a recombinação homóloga (PIVA, 2015). O sistema de recombinação Cre-loxP foi validado em *K. phaffii* utilizando o promotor nativo induzível por metanol, o  $P_{AOX1}$ . No entanto, a recombinação mediada por Cre-lox pode deixar “cicatrices” no genoma a cada reciclagem, podendo resultar em novos eventos de recombinação entre o loxP recém-introduzido e o antigo loxP da construção anterior (LI et al., 2017), embora este problema possa ser mitigado pelo uso de sítios loxP imperfeitos (ALBERT et al., 1995).

Já o método de reciclagem baseado na utilização de repetições diretas foi utilizado para expressar a marca de contrasseleção MazF também sob o comando do promotor  $P_{AOX1}$ , mostrando ser uma ferramenta que permite múltiplas modificações (YANG; JIANG; YANG, 2009). A expressão de *mazF* sob  $P_{AOX1}$  mediado por repetições de homologia foi utilizada na construção de cepas de *K. phaffii* indicando a funcionalidade desta estratégia (ZHANG et al., 2022).

Sabendo que o  $P_{AOX1}$  é uma importante ferramenta para construção de cepas em *K. phaffii* por ser fortemente induzido na presença de metanol, optamos por preservar este promotor e escolhemos o promotor induzido por ramnose,  $P_{LRA3}$ , para expressar *mazF*, como já foi previamente demonstrado por Jiao e colaboradores (JIAO et al., 2019).

### 3.2 CULTIVO EM BIORREATOR

As linhagens provenientes GLp1 e GLp2 foram cultivadas em biorreator para avaliação dos efeitos da substituição da enzima Gpd1 por Gpo (GLp1 e 2) na produção de ácido láctico em aerobiose. As curvas de crescimento, consumo de glicerol e produção de ácido láctico do cultivo das cepas GLp1 e GLp2 em batelada em UAB (6% glicerol) estão apresentadas na Figura 13.

**A. GLp1****B. GLp2**

**Figura 13. Consumo de glicerol, produção de lactato e crescimento celular das cepas GLp1 e GLp2 em aerobiose com 6% glicerol em batelada.**

Legenda: (quadrado azul): consumo de glicerol (g/L); (círculo rosa): crescimento celular ( $OD_{600}$ ); (triângulo verde): produção de lactato (g/L). Os gráficos representam a média de duplicatas.

A partir dos dados indicados na Figura 13, os parâmetros cinéticos foram calculados, como a velocidade específica de crescimento ( $\mu \text{ h}^{-1}$ ), o rendimento de substrato em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) e o rendimento de substrato em ácido láctico ( $Y_{P/s}$ ). Os parâmetros calculados para as cepas GLp1 e GLp2 estão indicados na Tabela 5.

**Tabela 5. Parâmetros cinéticos das cepas GLp1 e GLp2**

Cepa	Tempo de cultivo (h)	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$Y_{x/s}$	$Y_{P/s}$
GLp1	72	$0,158 \pm 0,019$	$0,264 \pm 0,049$	$0,004 \pm 0,000$
GLp2	90	$0,090 \pm 0,027$	$0,459 \pm 0,056$	$0,003 \pm 0,002$

Os dados indicaram que as cepas GLp1 e GLp2 não foram capazes de produzir ácido láctico, resultando em um total de 0,3 g/L e 0,1 g/L, respectivamente; ao passo que a cepa parental, GLp, produz aproximadamente  $\sim 10$  g/L quando cultivada

nas mesmas condições (6% de glicerol) (MELO et al., 2020). Até o momento, não há relatos na literatura da expressão heteróloga da enzima Gpo (glicerol-3-fosfato oxidase) de *A. viridans* em leveduras. Gpo catalisa a reação G3P/DHAP ao reduzir uma molécula de oxigênio molecular em peróxido de hidrogênio. Esta característica pode resultar em um aumento na demanda por oxigênio molecular no citosol, enquanto que o peróxido de hidrogênio contribui na geração de estresse oxidativo celular. Em conjunto, estas condições poderiam ser a razão pela qual ambas as linhagens com interrupção de *GPD1* apresentaram tempo de adaptação no biorreator superior a 20 h.

No entanto, o efeito do peróxido de hidrogênio poderia ser atenuado na cepa GLp2, visto que expressa o gene da enzima catalase (*NcCAT1*) no citosol. Porém, a cepa GLp2 apresentou menor velocidade específica de crescimento ( $\mu$ :  $0,090 \pm 0,027$  h<sup>-1</sup>) e menor rendimento de produção de lactato ( $Y_{P/S}$   $0,003 \pm 0,002$ ) quando comparada à cepa sem a catalase citosólica (GLp1) (Tabela 5). Isto pode indicar que, bem como a expressão de *GPO*, a expressão da enzima catalase no citosol impôs dificuldades para a levedura.

A interrupção de *GPD* (*Gpd1/Gpd2*) já foi descrita em cepas da levedura *S. cerevisiae* na produção de ácido láctico (KONG et al., 2019). Porém, esta estratégia é utilizada com o intuito de reduzir a produção de glicerol, um coproduto recorrente do metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae* (KIM et al., 2019b). Na construção da linhagem *S. cerevisiae* SP2, a interrupção dos genes *PDC1*, *CYB2*, *GPD1* para atenuar a produção de etanol, evitar a degradação de lactato e evitar a formação de glicerol, respectivamente, foram obtidas pela integração do gene *LDH* de *P. sinensis*. O cultivo da cepa SP2 em frascos utilizando resultou produção de 35 g/L de ácido láctico, contudo a cepa não dependia da via de metabolização de glicerol, já que o processo baseou-se em glicose (80 g/L) (KONG et al., 2019). Desta maneira, para *S. cerevisiae* a deleção de *GPD* aliada a outras estratégias foi benéfica para a produção de ácido láctico. Em contrapartida, a ausência da atividade de Gpd pode resultar na geração de cepas sensíveis ao estresse osmótico e na redução da taxa específica de crescimento (ANSELL et al., 1997).

## 4 CONCLUSÃO

Nesta etapa do trabalho foi possível selecionar os métodos mais adequados para a geração do material genético para transformação utilizando RCA (APÊNDICE 3), definir o método de transformação de *K. phaffii* e verificar a eficácia do método utilizado para a reciclagem de marca utilizando o promotor  $P_{LRA3}$  e o gene da endonuclease *MazF*.

Contudo, será discutido adiante no segundo capítulo que várias cepas desenvolvidas neste trabalho perderam o cassete que expressa a LDH, responsável pela produção de ácido láctico. Assim, os resultados obtidos dos cultivos das cepas GLp1 e GLp2 não são suficientes para concluir a ineficácia da estratégia de deleção de *GPD1* e inserção de *GPO*.

A inserção de *GPO*, uma enzima da classe das oxidases ( $O_2$ ), requer que o processo de produção de ácido láctico nas cepas GLp1 e GLp2 seja conduzido em aerobiose. Porém, em aerobiose o glicerol é majoritariamente utilizado para a formação de biomassa, visto que o metabolismo fermentativo em *K. phaffii* só é induzido em hipóxia. Assim, a deleção de *GPD1* com inserção de *GPO* foi pensada como estratégia complementar à estratégia descrita no segundo capítulo, a qual consiste em reduzir os efeitos da respiração celular em aerobiose.

## SEGUNDO CAPÍTULO: DELEÇÃO DE *MPC1*

Parte dos resultados deste capítulo foi publicada na revista *Microorganisms* (IF 4,926), volume 11, n. 2, p. 483. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/483>

### 1 INTRODUÇÃO

O ácido láctico é o produto final do metabolismo de carboidratos em que o piruvato é utilizado como substrato para a enzima lactato desidrogenase (LDH). Portanto, por depender da concentração citosólica de piruvato, diversas estratégias registradas na literatura consistem em evitar o desvio de piruvato para a formação de coprodutos. Em fungos e leveduras, esta estratégia pode ser obtida pelo nocaute de genes das isoformas da enzima piruvato descarboxilase (Pdc) e da enzima álcool-desidrogenase (Adh) para evitar que o piruvato seja utilizado na formação de acetato e etanol durante o metabolismo fermentativo. A deleção combinada de *PDC* e *ADH* para a produção de ácido láctico foi reportada na construção de cepas em *S. cerevisiae* (BAEK et al., 2016; SONG et al., 2016; YAMADA et al., 2017) e *Kluyveromyces marxianus* (BAE et al., 2018). A deleção de *PDC* é uma das estratégias mais reportada para a produção de ácido láctico em hipóxia (Tabela 1).

Em aerobiose, o piruvato pode ser direcionado do citosol para as mitocôndrias para servir como substrato da respiração celular. Portanto, a inibição da captação de piruvato pelas mitocôndrias é um fator a ser considerado em processos aeróbicos em que se utilizem leveduras com metabolismo Crabtree negativo, como é o caso de *K. phaffii*. O piruvato citosólico resultante da glicólise atravessa a membrana mitocondrial externa através das porinas, e é então transportado através da membrana interna por um transportador formado por um hétero-complexo nomeado transportador mitocondrial de piruvato (Mpc) (BENDER; MARTINOU, 2016). Este transportador é conservado em mamíferos, *Drosophila* e leveduras, podendo ser formado pelas combinações de subunidades Mpc1/Mpc2 ou Mpc1/Mpc3 (BRICKER et al., 2012; HERZIG et al., 2012), sendo a porção Mpc1 indispensável (BENDER; MARTINOU, 2016).

As estratégias delineadas no primeiro capítulo são favorecidas pelo cultivo em aerobiose para atender à enzima glicerol-3-fosfato oxidase (GPO). A deleção do gene *MPC1* pode favorecer a produção de ácido láctico nestas cepas ao reter piruvato no

citossol em razão do bloqueio do transportador Mpc. Em *A. oryzae*, a deleção de *MPCA*, ortólogo de Mpc1 de *S. cerevisiae*, resultou em um aumento de aproximadamente 30% em relação a cepa selvagem. A cepa com deleção de *PDC* e *MPC* com a expressão da LDH bovina resultou na produção de 81,2 g/L a partir de 100 g/L de glicose (ZHANG et al., 2020a).

Esta estratégia se mostrou viável em um teste de conceito em *K. phaffii*. Várias drogas descritas na literatura possuem a capacidade de bloquear a atividade de Mpc, entre eles o composto ácido 2-ciano-3-(1-fenil-1H-indol-3-il)-2-propenóico, comercialmente conhecido por UK-5099 (Sigma-Aldrich) (HALESTRAP, 1975). Em uma prova de conceito realizado por Melo (2021), a adição de UK-5099 após 15 h do cultivo da cepa GLp em batelada resultou em um aumento de aproximadamente 5-vezes na produção de ácido láctico (MELO, 2021).

Apesar de as estratégias terem sido idealizadas para o cultivo em aerobiose, o oxigênio molecular é pouco solúvel em solução aquosa, o que pode resultar em uma hipóxia funcional em cultivos em grandes volumes. Além disso, a expressão de Gpo, descrita no primeiro capítulo, pode aumentar a demanda por oxigênio nas novas cepas geradas. Como estratégia complementar, a deleção de *MPC1* será realizada pela integração do cassete que expressa o gene na hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* (*vhb*). Estudos anteriores demonstraram que a expressão do gene *vhb* em *K. phaffii* melhorou a produtividade da expressão heteróloga de proteínas (CHEN et al., 2007; WANG; LI; LIU, 2016). Contudo, sabendo que a síntese de hemoglobina irá demandar energia das células, que já possuem outras modificações, o gene *vhb* com otimização de códons para *K. phaffii* será clonado sob o promotor álcool desidrogenase 2 ( $P_{ADH2}$ ) de *Scheffersomyces stipitis* induzível por baixas concentrações de oxigênio (CHIEN; LEE, 2005). Desta forma, a síntese de hemoglobina ocorrerá apenas quando houver demanda intracelular por oxigênio, como descrito em trabalho por Chien e Lee (2005).

## 1.1 OBJETIVOS

Minimizar a utilização do piruvato para a respiração celular durante a produção de ácido láctico em aerobiose pela deleção do gene *MPC1*.

- a) Expressar o cassete que expressa o gene *vhb* de *Vitreoscilla stercoraria* sob o comando do promotor  $P_{ADH2}$  de *S. stiptis* induzível por hipóxia em cepas produtoras de ácido láctico (XL e GLp), concomitante ao nocaute do gene *MPC1*;
- b) Avaliar o fenótipo de cepas nocaute para *Mpc1*;
- c) Avaliar a produção de ácido láctico em cepas deficientes de *Mpc1* em batelada em aerobiose.

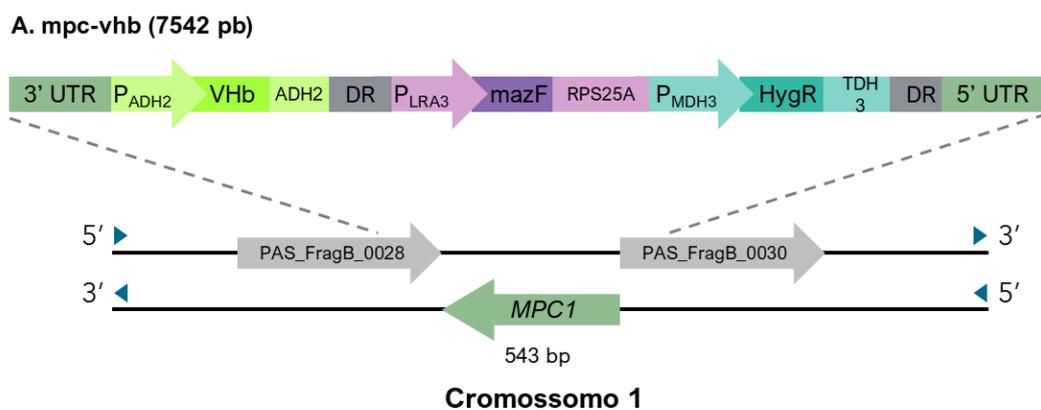
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada na transformação, confirmação por PCR, reciclagem da marca de seleção, cultivo em biorreator e detecção de metabólitos em HPLC está descrita no Capítulo 1. Os métodos específicos a este capítulo estão descritos abaixo.

### 2.1 CONSTRUÇÃO DE CEPAS

Como genes *MPCs* não foram anotados no genoma de *K. phaffii*, foi feita uma busca no NCBI utilizando a ferramenta de alinhamento BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) utilizando a sequência anotada de *S. cerevisiae*. A busca revelou uma ORF de 387 pb no cromossomo 1 para a proteína hipotética em *K. phaffii* com sob o número de acesso XM\_002490794.1. O alvo determinado para a interrupção da atividade do transportador Mpc foi a subunidade 1 (Mpc1), visto que estudos relatam ser a unidade essencial para a formação do complexo (Bender et al., 2015; Bender e Martinou, 2016).

O cassete para a deleção de *MPC1* possui 700 pb da região 3' UTR da fita líder logo antes do final do gene (*PAS\_FragB\_0028*) e 700 pb da região 5' UTR antes do códon de início de *MPC1* (*PAS\_FragB\_0030*) para guiar a recombinação homóloga (Figura 14). Além da região destinada à seleção e contrasseleção, descrita em detalhes no capítulo 1, o cassete carrega o gene na hemoglobina de *V. stercoraria* (*vhb*) com otimização de códons para *K. phaffii* sob o promotor álcool desidrogenase 2 (*P<sub>ADH2</sub>*) de *S. stipitis*. O cassete foi sintetizado por GenScript (Piscataway, NJ, EUA).



**Figura 14. Cassete para deleção do gene *MPC1* em *K. phaffii***

Fonte: A autora (2023). As setas tracejadas indicam os sítios de recombinação homóloga presentes na fita líder do cromossomo 1 de *K. phaffii*.

Duas cepas de *K. phaffii* foram transformadas com o cassete para a deleção de *MPC1*, XL (LIMA et al., 2016) e GLp (MELO et al., 2018). As cepas derivadas assim como os materiais genéticos utilizados estão resumidos na Tabela 6 e 7.

**Tabela 6. Plasmídeos utilizados no segundo capítulo**

<b>Plasmídeos</b>	<b>Utilização</b>	<b>Referência</b>
mpc-VHb	Deleção do gene que expressa o transportador mitocondrial de piruvato ( <i>MPC1</i> ) pela inserção do gene <i>VHb</i> (hemoglobina de <i>Vitreoscilla stercoraria</i> ) sob o comando do promotor P <sub>ADH2</sub> de <i>S. stipitis</i> .	Este trabalho
pGAP-LDH	Integração do gene da <i>LDH</i> no locus GAP de <i>K. phaffii</i> . Foram construídos 4 plasmídeos que expressam as LDHs de <i>B. taurus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> e <i>L. helveticus</i> .	Acervo pessoal (Integra)

**Tabela 7. Cepas utilizadas no segundo capítulo**

<b>Cepas</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Referência</b>
XL	X-33: pGAP- <i>BtLDH</i>	Lima et al., 2016
GLp	GS115: pGAP- <i>BtLDH</i> $\Delta$ pdc1 <i>HIS4</i>	Melo et al., 2018
XLm	XL: $\Delta$ mpc1	
XLm1	XLm: gpd1::gpo <i>Hyg</i> <sup>R</sup>	
XLm2	XLm: gpd1::gpo NcCAT1 <i>Hyg</i> <sup>R</sup>	Este trabalho
XLm1 <i>hyg</i> -	XLm: gpd1::gpo	
XLm2 <i>hyg</i> -	XLm: gpd1::gpo NcCAT1	
XmBt	Xm* + pGAP-LDHBt	
XmLp	Xm* + pGAP-LDHLp	
XmLc	Xm* + pGAP-LDHLc	Este trabalho
XmLh	Xm* + pGAP-LDHLh	
GLpm	GLp: gpd1::gpo <i>Hyg</i> <sup>R</sup>	Este trabalho

Fonte: A autora (2023). \*Reinserção da enzima LDH no sítio de integração GAP.

### 2.1.1 PCR quantitativa

O RNA total foi extraído de algumas amostras coletadas durante o cultivo em biorreator para avaliar a expressão relativa do gene *vhb*. As amostras foram centrifugadas para a remoção completa do meio de cultivo. O RNA total foi extraído e tratado com DNase I usando o Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Um total de 250 ng de RNA foi submetido à transcrição reversa utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, EUA). Os cDNAs foram diluídos com água livre de nuclease e amplificados por PCR utilizando o mix de reação

Forget-Me-Not™ EvaGreen® qPCR Master Mix (Low ROX) (Biotium, Fremont, CA, EUA) no sistema 7500 *Fast Real-Time* PCR (ThermoFisher Scientific). A expressão de *vhb* em amostras de GLpm foi analisada em triplicata usando o gene *ACT1* de *K. phaffii* como controle constitutivo. Os iniciadores utilizados estão listados à Tabela 1 e suas sequências, no APÊNDICE 2. A quantificação relativa (RQ) da hemoglobina bacteriana (*vhb*, Figura 15) foi calculada usando o método  $-\Delta\Delta C_t$  no Software 7500 v2.3 (ThermoFisher Scientific).

#### 2.1.1.1 Extração de RNA total utilizando FAE

Apesar de o RNA total utilizado neste protocolo ter sido proveniente da extração com sistema comercial, outro método para extração de RNA demonstrou eficácia em *K. phaffii*, o método de extração com a solução de 98% formamida e 10 mM EDTA (FAE) descrito para *S. cerevisiae* (SHEDLOVSKIY; SHCHERBIK; PESTOV, 2017). Neste método, uma alíquota da cultura referente a uma unidade de OD<sub>600</sub> (Ex. 500 µL × 2 OD<sub>600</sub> = 1 unidade) foi centrifugada a 15000 rpm por 30 s. Após a remoção completa do meio de cultivo, 30 a 40 µL de solução FAE foram utilizados para ressuspender as células. As amostras foram incubadas a 70 °C por 10 min em termobloco. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas 15000 rpm por 2 min. Aproximadamente 2/3 do volume foram coletados e armazenados em novo tubo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CEPAS CONSTRUÍDAS EM XL

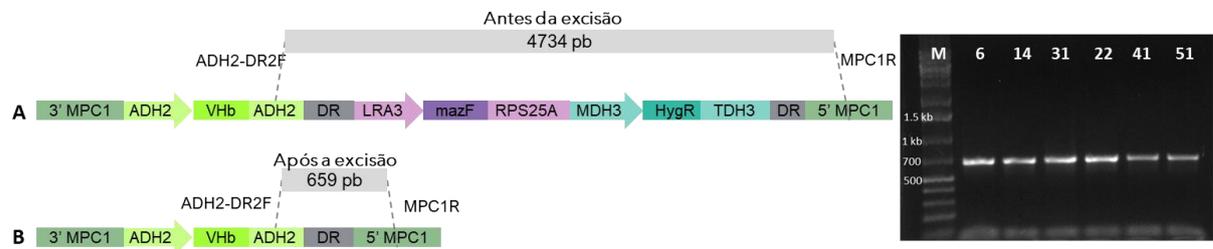
Após sucessivas tentativas malogradas em transformar a cepa GLp com o cassete de deleção de *MPC1*, a cepa XL foi selecionada por possuir o gene *PDC1* intacto. A cepa XL foi a primeira cepa de *K. phaffii* construída a partir da integração do gene *BtLDH* sob o comando do promotor  $P_{GAP}$  na cepa selvagem X-33 (LIMA et al., 2016). Assim, seria possível verificar se o insucesso da transformação está relacionado a algum defeito no cassete ou na impossibilidade de gerar uma cepa deficiente de *PDC1/MPC1*.

Os clones recuperados da placa de transformação de XL foram verificados inicialmente para a presença do cassete *mpc-VHb* com os oligos ADH2-DR2F e pLRA3R, que se anelam respectivamente ao terminador *ADH2tt* do cassete que expressa *vhb* e ao promotor  $P_{LRA3}$  do cassete de contrasseleção (Figura 15). Esta reação resulta em um amplicon de 870 pb, o que resultou na seleção de 4 transformantes (13,15, 22 e 24) (Figura 15A).

Porém, na reação de PCR com os oligos MPC1F e MPC1R, que se anelam respectivamente nas regiões 3'MPC1 e 5'MPC1, houve amplificação do gene intacto (543 pb) nos clones 13 e 15 (Figura 15B). Já nos transformantes 22 e 24 a ausência de amplificação sugere a correta inserção no *locus* de *MPC1*, visto que a inserção resultaria em uma amplificação de 6298 pb, a qual não ocorre nas condições adotadas e pela enzima DNA polimerase utilizada. Portanto, os dois transformantes, 22 e 24, foram selecionados como sendo da linhagem XLm.



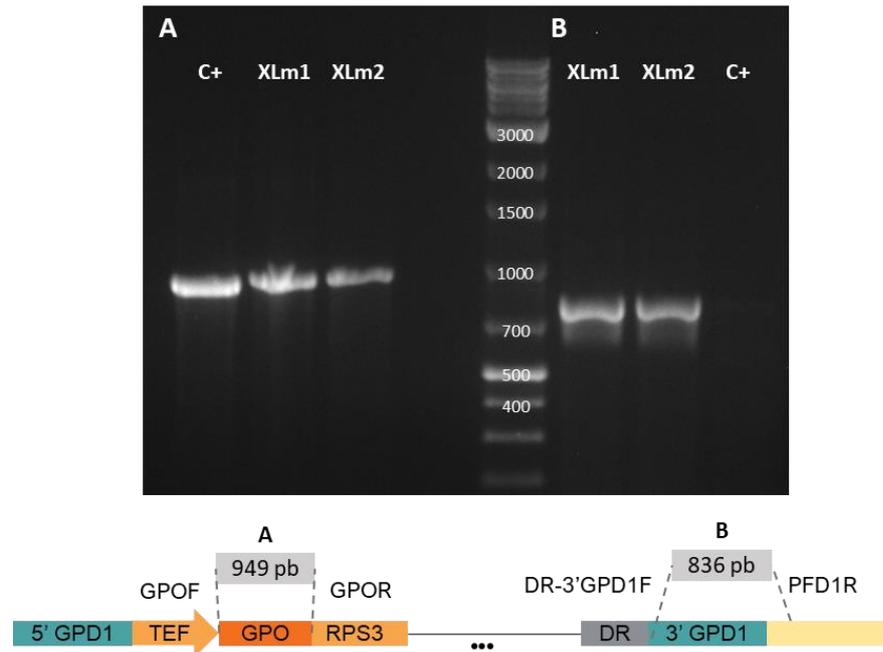
homologia 5'MPC1. A reação funcionará apenas se a reciclagem tiver ocorrido, gerando um amplicon de 659 pb.



**Figura 16. Reciclagem da marca de seleção em XLM após a transformação com o cassete para deleção de MPC1**

Legenda: **A.** Cassete mpc-vhb antes da reciclagem de marca. **B.** Cassete mpc-vhb após a reciclagem de marca. Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação com os oligos que confirmam a perda do cassete de seleção e contrasseleção. Os clones 6 e 14 são derivados de XLM-22 e os clones 31, 22, 41 e 51, de XLM-24. Marcador: 1 kb ladder plus (M1191), Sinapse Biotecnologia.

O clone 51 da cepa XLM *hyg-* foi selecionado para as transformações com os cassetes 1-gpo e 2-gpo\_cat para a construção das cepas XLM1 e XLM2, respectivamente. Após 4 dias de incubação das placas de transformação, foram repicados 54 clones da transformação com 1-gpo e apenas 3 clones da transformação com 2-gpo\_cat. A confirmação da integração dos cassetes no *locus* de *GPD1* (DR-3'GPD1F e PFD1R) e a integração de *GPO* (GPOF e GPOR) se deu de forma similar à construção das cepas GLp1 e GLp2 (Seção 3.1, Cap. 1). Os oligonucleotídeos GPOF e GPOR amplificam 949 pb do gene *GPO* (Figura 17A). Na segunda reação para confirmar a inserção no *locus*, DR-3'GPD1F se anela na região interna do cassete, enquanto o oligonucleotídeo PFD1R se anela a jusante da região de recombinação, gerando um amplicon de 836 pb nos transformantes (Figura 17B).

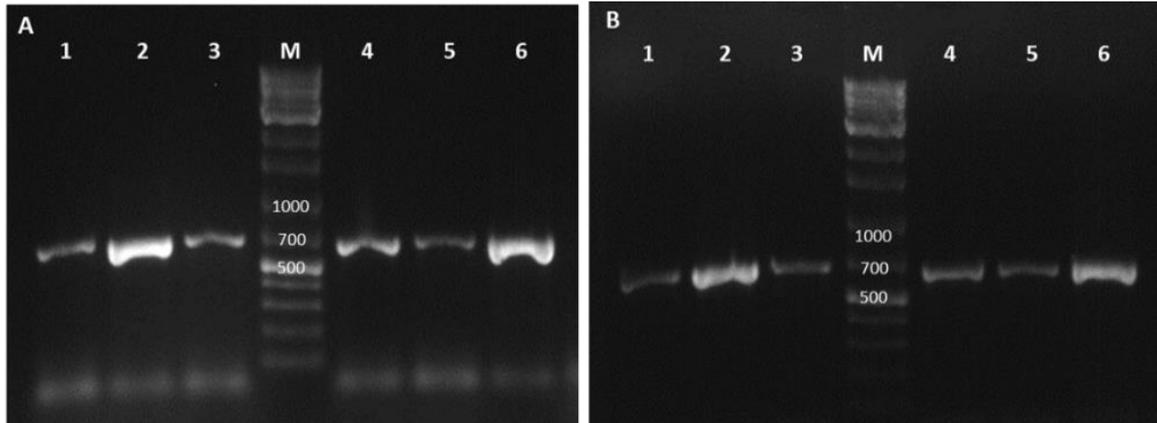


**Figura 17. Construção das cepas XLm1 e XLm2**

Legenda: Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação de 949 pb de *GPO* (A). C+: Plasmídeo. A amplificação de 836 pb (B) que confirma a interrupção de *GPD1*. C+: DNAg cepa selvagem (GS115). Marcador: 1 kb ladder plus (M1191) Sinapse Biotecnologia.

A partir da integração dos cassetes de deleção de *GPD1* para a construção de XLm1 e XLm2, as linhagens ficam novamente resistentes a higromicina. Como citado anteriormente, as regiões DR são distintas entre os cassetes para permitir as sucessivas reciclagens. E desta forma, as cepas XLm1 e XLm2 também passaram pelo processo de reciclagem de marca como já descrito em outras cepas.

A Figura 18 apresenta os dois géis que confirmam os dois eventos de reciclagem de marca durante a construção de XLm1 (1-3) XLm2 (4-6). À Figura 18A, a amplificação de 637 pb resulta da reação com os oligonucleotídeos RPS3F e DR1-GPD1R presente nos dois cassetes de deleção de *GPD1*. A reação com os oligonucleotídeos ADH2-DR2F e MPC1R amplifica 659 pb após a reciclagem no cassete mpc-vhb.



**Figura 18. Confirmação da reciclagem da marca de seleção em XLm após a transformação com os cassetes para deleção de *GPD1***

Legenda: Géis de agarose (1%) que indicam a cicatriz dos dois eventos de reciclagem de marca entre as regiões DR na construção de XLm1 e XLm2. **A.** DR1 – cassetes 1-gpo (1-3), cepa XLm1, e 2-gpo\_cat (4-6), cepa XLm2. **B.** DR2 – cassete mpc-vhb. M: Ladder 1kb plus (Sinapse Biotecnologia).

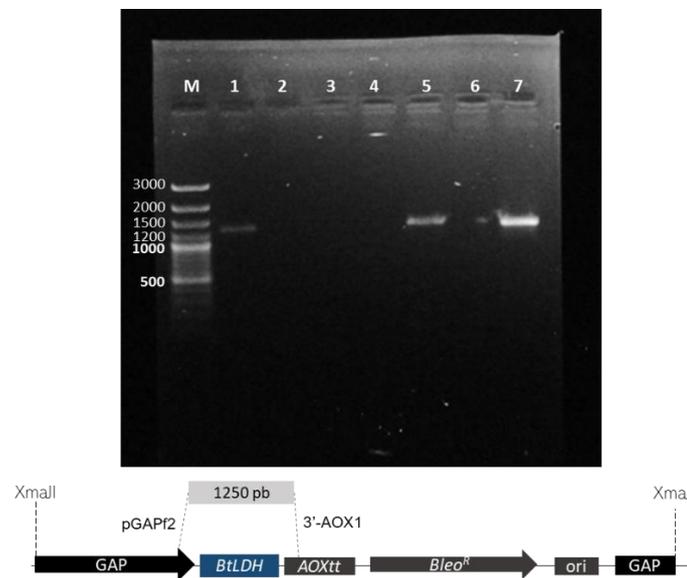
### 3.1.1 Avaliação das cepas XLm1 e XLm2

As linhagens XLm1 e XLm2, ambas com genótipo *hyg-*, foram cultivadas em batelada no biorreator de 1,3-L (BioFlo 115, Eppendorf) em meio definido UAB com 6% glicerol. Os parâmetros utilizados foram os mesmos descritos no primeiro capítulo. Assim como observado nas cepas GLp1 e GLp2, as cepas XLm1 e XLm2 não produziram ácido láctico. Porém, coprodutos, como acetato ou arabitól, não foram detectados em concentrações que indicassem o destino da conversão de glicerol. Assim, as amostras dos cultivos após detecção em HPLC foram analisadas novamente no software LabSolutions a fim de identificar possíveis coprodutos.

Nesta avaliação, foi identificado um pico no tempo de retenção 10,843 min no detector UV-Vis cuja área e altura aumentavam à medida em que as amostras de tempos mais tardios eram avaliadas, do tempo zero ao fim do cultivo, sugerindo um aumento da concentração do metabólito correspondente. Este composto foi identificado como sendo o piruvato, ao se avaliarem os tempos de retenção de compostos detectados no detector UV-Vis. Uma curva de calibração com seis concentrações de piruvato confirmaram esta suspeita.

Desta maneira, este resultado sugere que existe um excesso de piruvato sendo formado no interior da célula ao ponto de se tornar possível detectá-lo no sobrenadante do cultivo, sugerindo que a ausência de ácido láctico poderia estar relacionada à falta de atividade da enzima LDH nestes clones.

A inserção do gene *BtLDH* foi concretizada em trabalhos anteriores (LIMA et al., 2016; MELO et al., 2018). Portanto, uma reação de PCR foi feita com os oligonucleotídeos pGAPf2 e 3'-AOX1, provenientes do acervo do laboratório, e que se anelam ao promotor  $P_{GAP}$  e ao terminador  $AOXtt$ , resultando em um fragmento de 1250 pb (Figura 19). Nesta reação, o DNAg das cepas XLm, XLm1, XLm2, GLp1 e GLp2 foram utilizados, além do DNAg das cepas parentais XL e GLp. Além disso, o DNAg da cepa GLp1 resistente à higromicina ( $Hyg^R$ ) foi utilizado, ou seja, o clone anterior ao processo de reciclagem de marca. Assim, foi possível identificar que, além de GLp1, nenhuma cepa construída neste trabalho apresentava mais o cassete de *LDH*.



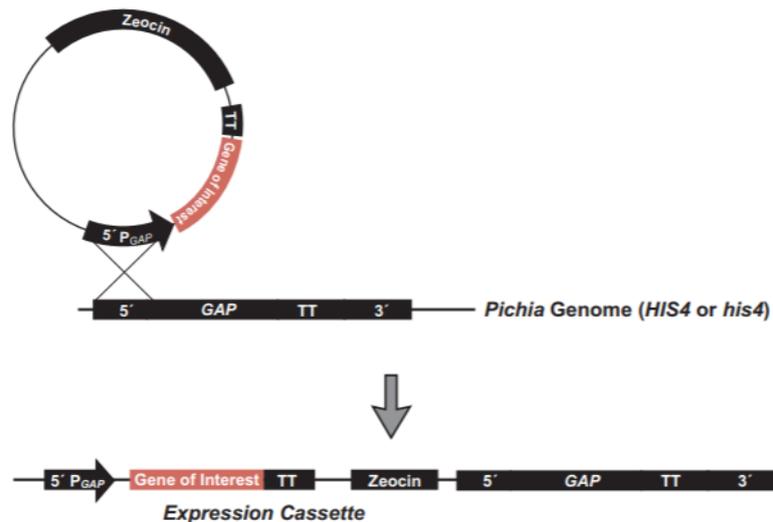
**Figura 19. Avaliação da presença do cassete pGAP-*BtLDH***

Legenda: Gel de agarose (1%) mostrando o resultado da reação de amplificação de 1250 pb do cassete pGAP-*BtLDH* nas cepas (1) XL (parental), (2) XLm  $hyg^-$ , (3) XLm1, (4) XLm2, (5) GLp1  $Hyg^R$ , (6) GLp2  $hyg^-$ , (7) GLp (parental). Marcador: GeneRuller™ 100pb Plus DNA Ladder.

A amplificação do cassete de expressão de *LDH* ocorreu nas cepas que deram origem às linhagens desenvolvidas neste trabalho, XL (poço 1) e GLp (poço 7). Isto sugere que o cassete foi perdido durante o processo de criação das novas cepas, e que este evento provavelmente está relacionado ao processo de reciclagem de marca visto que este método seleciona indivíduos que passaram pelo processo de recombinação homóloga. Além disso, não houve amplificação do cassete de *LDH* nas cepas finais (Figura 19, poços 2,3,4 e 6).

A integração no sítio GAP a partir da linearização do plasmídeo comercial pGAPZB é descrita como estável no manual do fornecedor (Invitrogen). Segundo o

manual descrito pela Invitrogen para expressão em *K. phaffii*, a integração no sítio *GAP* pode ocorrer em eventos de inserções, que são mais frequentes, e eventos de substituição. Portanto, é esperado que ocorram eventos de inserção do gene no *locus GAP* a partir de um único evento de recombinação entre o *locus GAP* do genoma e a região do promotor no cassete pGAP-LDH como ilustrado na Figura 20.



**Figura 20. Integração do plasmídeo pGAP no *locus GAP* de *K. phaffii***

Fonte: Invitrogen (pGAPZ A, B, C and pGAPZ $\alpha$  A, B, C Manual)

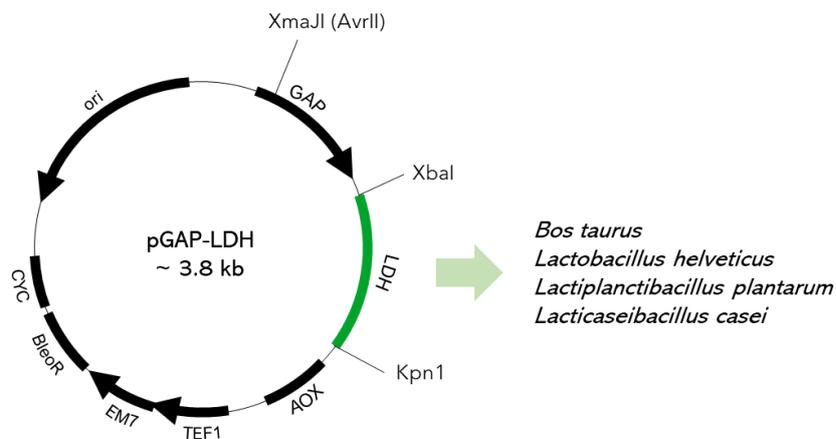
Esta integração resultaria pode ter resultado na duplicação de fragmentos da região 5' do promotor  $P_{GAP}$ . Assim, durante a reciclagem de marca, pode ocorrer o rearranjo e expulsão do cassete da *LDH* pela recombinação interna dos segmentos duplicados do *locus GAP*. Como o sistema DR-mazF seleciona células que sofrem eventos de recombinação interna para reciclagem de marca, isto poderia ter favorecido a seleção de transformantes que perderam a *LDH* pelo mesmo mecanismo. Contudo, apenas com o sequenciamento de cepas seria possível confirmar esta hipótese.

### 3.1.2 Reinserção do gene da LDH nas cepas provenientes de XL

Após a confirmação da perda do cassete  $P_{GAP}$ -*BtLDH*, a alternativa inicial foi reintegrar o gene da LDH utilizando materiais já disponíveis no acervo de trabalhos anteriores (Integra, 2016). Estes plasmídeos expressam, separadamente, o gene *LDH* de *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplanctibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei* e

*B. taurus*. Os plasmídeos foram sintetizados por Gene Syn Vector (Huntsville, AL, EUA).

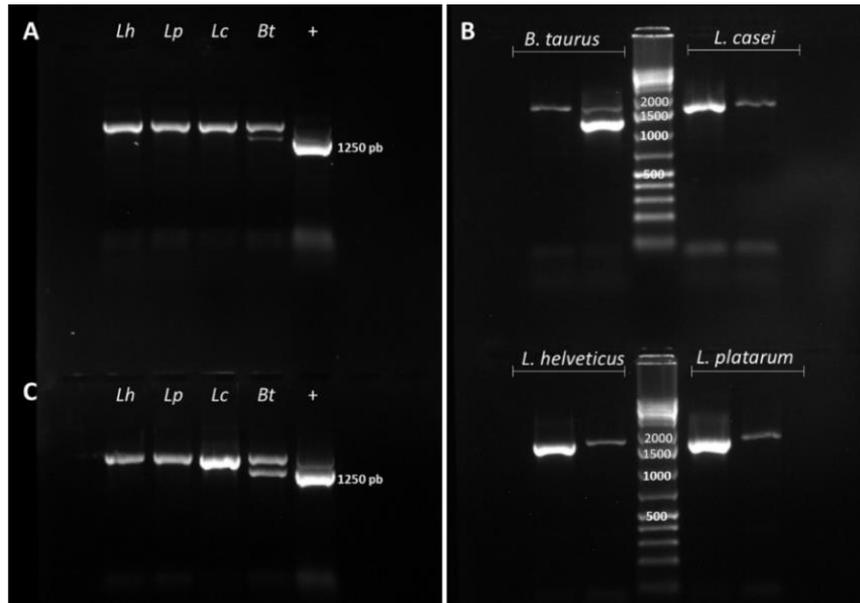
O tratamento com a endonuclease XmaJI (AvrII) lineariza o plasmídeo e fornece as extremidades com regiões de homologia ao *locus* de GAP do genoma de *K. phaffii*. Além disso, a seleção é feita por meio da expressão do gene de resistência a zeocina (*BleoR*). Foram feitas 12 transformações, para integrar, separadamente, os 4 genes LDHs nas cepas XLm (Xm), XLm1 (Xm1) e XLm2 (Xm2), que perderam o cassete anteriormente.



**Figura 21. Mapa do plasmídeo pGAPZ B utilizado para a expressão de LDHs (acervo pessoal)**

Fonte: A autora (2023). O tamanho indicado na figura de aproximadamente 3,8 kb, visto que irá variar a depender do gene de LDH de cada vetor. O sítio de restrição da enzima XmaJI (AvrII) irá permitir a integração no *locus* GAP em *K. phaffii*.

A confirmação da integração dos cassetes utilizou os oligonucleotídeos que se anelam ao promotor  $P_{GAP}$  (pGAPf2) e ao terminador AOXtt (3'AOX1) indicando a presença do cassete nas três linhagens após a transformação.



**Figura 22. Transformação das cepas provenientes de XL para avaliar a expressão de 4 LDHs**  
 Legenda: Gel de agarose (1%) mostrando o resultado da reação de amplificação do cassete pGAP-LDH nas cepas XLm (A), XLm1 (B) e XLm2 (C). Marcador: Ladder 1kb plus M1191 (Sinapse Biotecnologia).

Apesar do resultado indicado na Figura 22, sugerindo a integração de diferentes LDHs nas três cepas provenientes de XL, não houve sucesso da re inserção no sentido de restaurar a produção de ácido láctico nestas linhagens. Este resultado foi de certo modo esperado, pois os cassetes que expressam as LDHs de BAL (*L. helveticus*, *L. plantarum* e *L. casei*) não haviam apresentado resultados satisfatórios nos trabalhos anteriores, porém foram retomados visto que foi o material disponível no momento (dados não apresentados. Integra, 2016).

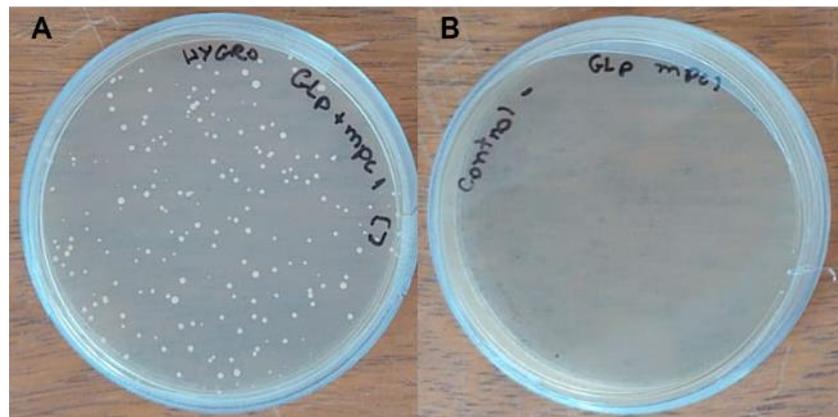
Além disso, o cassete que resulta na integração da LDH de *B. taurus* foi o mesmo cassete utilizado na construção da cepa parental XL, o que resultou na amplificação de dois fragmentos nas três cepas, XLm, XLm1 e XLm2 indicados na Figura 22A, B e C, respectivamente. Esta amplificação pode indicar que um novo rearranjo interno ocorreu visto que foram reutilizados cassetes que foram perdidos previamente em eventos ainda não esclarecidos. Desta forma, a re inserção se mostrou ineficiente em restaurar a produção de ácido láctico nestas cepas.

### 3.2 CEPA GLpm

Os resultados desta seção foram publicados na revista *Microorganisms* (IF 4,926), volume 11, n. 2, p. 483. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/483>.

#### 3.2.1 Seleção de clones

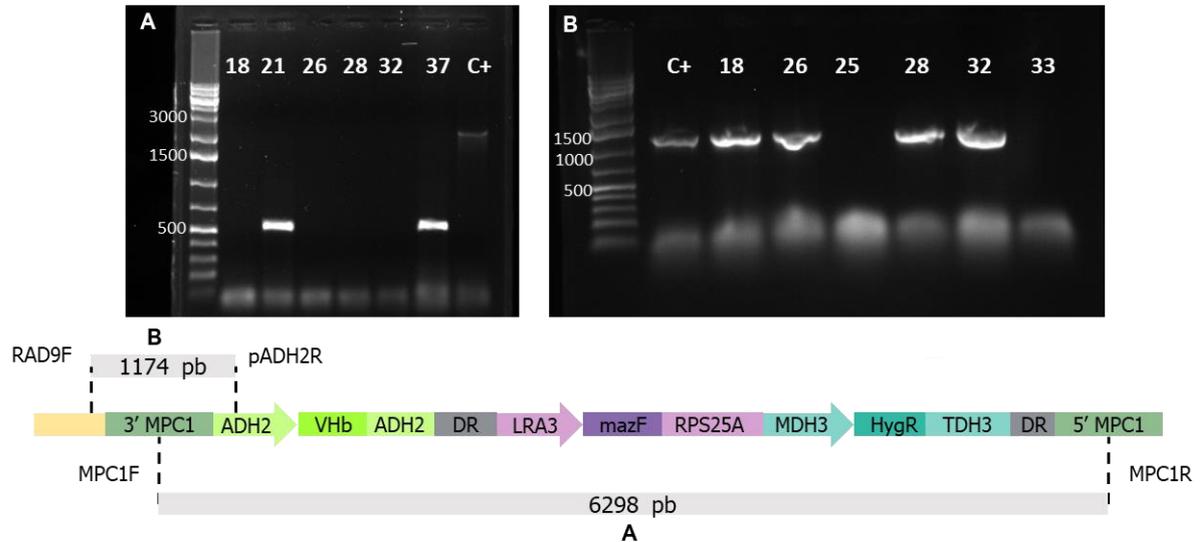
Ao passo que as cepas provenientes de XL eram construídas e avaliadas, foram realizadas paralelamente novas tentativas de se transformar a cepa GLp para a deleção de *MPC1* para gerar a cepa GLpm. No processo de transformação, após a recuperação são plaqueadas alíquotas de aproximadamente 0,1 mL. Neste caso, as células foram concentradas e todo o conteúdo foi plaqueado em YPD com higromicina a 0,2 mg/mL, como ilustrado na Figura 23A.



**Figura 23. Placas YPD com 0,2 mg/mL de higromicina da transformação de GLp**

Legenda: Placas de YPD com 0,2 mg/mL de higromicina. **A.** GLp após transformação com o cassete mpc-vhb. **B.** Controle negativo: GLp após transformação utilizando água.

As colônias foram repicadas para um novo meio de YPD seletivo e clones foram selecionados para a confirmação por PCR. Na figura 24 estão apresentadas as imagens dos géis de agarose que confirmam as construções corretas nos transformantes 18, 26, 28 e 32 pela reação com os oligonucleotídeos MPC1R e MPC1R (Figura 24A) e RAD9F e pADH2R (Figura 24B).



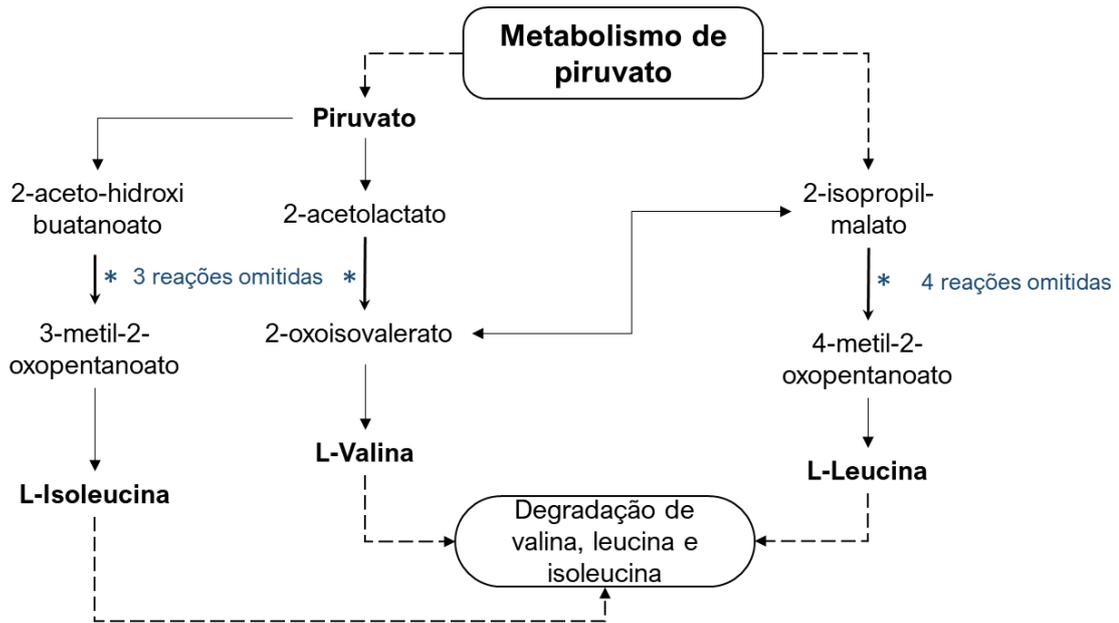
**Figura 24. Confirmação da construção da cepa GLpm**

Legenda: **A.** Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação de 543 pb indicando *MPC1* intacto. O DNAg de XLM *hyg-* foi utilizado como controle positivo da reação (~3 kb). Não há amplificação nos clones em que a integração do cassete ocorreu no *locus*, pois a reação resultaria em um amplicon de 6298 pb. **B.** Gel de agarose (1%) mostrando a amplificação de 1174 pb, indicando a integração correta no *locus*. O DNAg de XLM *hyg-* foi utilizado como controle positivo. Marcador: 1 kb ladder plus (M1191) Sinapse Biotecnologia.

Visto que a reciclagem de marca resultou na perda do cassete de expressão da LDH nas cepas construídas anteriormente, os clones de GLpm não passaram pela etapa de reciclagem de marca.

### 3.2.2 Curvas de crescimento de GLp e GLpm

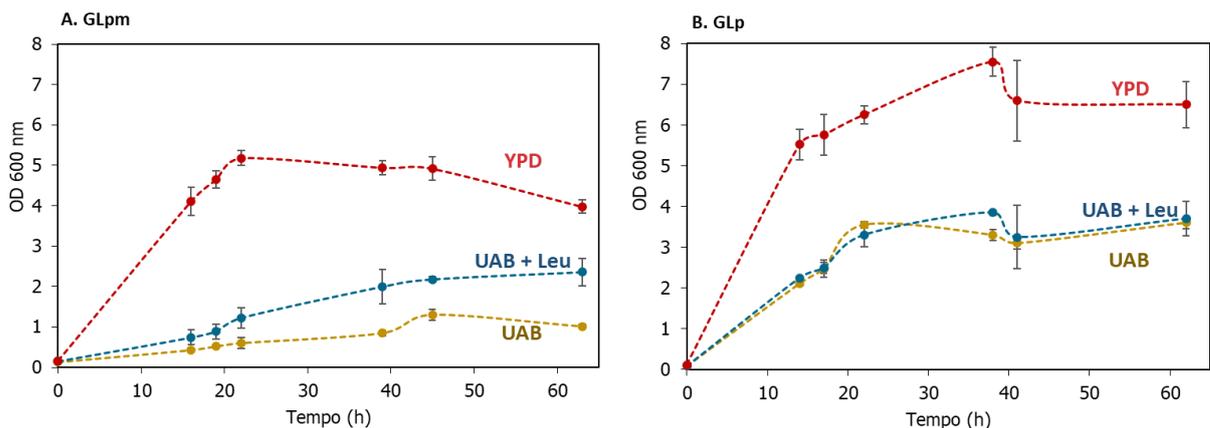
De acordo com a literatura, a deleção de *MPC1* resulta na ineficiência da cepa em crescer em meio mínimo definido, sendo o crescimento restaurado pela suplantação de aminoácidos, em especial a L-leucina (BRICKER et al., 2012; HERZIG et al., 2012). Ao avaliar a via biossintética de aminoácidos em *K. phaffii* no banco de dados online KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), foi possível avaliar que a síntese de L-leucina requer precursores provenientes do metabolismo de piruvato, como o 2-isopropil-malato, enquanto a via de síntese de L-isoleucina e L-valina derivam diretamente de piruvato. A Figura 25 ilustra as vias biossintéticas destes aminoácidos em *K. phaffii*.



**Figura 25. Vias biossintéticas de L-Isoleucina, L-Valina e L-Leucina em *K. phaffii***

Fonte: A autora (2023) baseado no banco de dados KEGG.

O crescimento de *K. phaffii* selvagem e nocaute para Mpc1 foi avaliado em cultivos em placas (APÊNDICE 4), porém a discrepância entre cepas foi avaliada quantitativamente em meio líquido. As curvas de crescimento da cepa parental (GLp) e da cepa GLpm estão apresentadas na Figura 26, e as taxas de crescimento específicas são apresentadas na Tabela 8.



**Figura 26. Curvas de crescimento de cepas de *K. phaffii***

Legenda: YPD (vermelho), UAB (amarelo) e UAB com L-leucina (azul). Os cultivos foram feitos em triplicatas biológicas.

Como esperado, ambas as cepas apresentaram melhor crescimento em meio rico e complexo, tanto em glicose quanto em glicerol, quando comparadas ao cultivo em meio UAB (Figura 26A e B). Porém, GLp atingiu OD<sub>600</sub> máxima próximo de 8,0, enquanto GLpm a OD<sub>600</sub> máxima ficou em torno de 5,5. Esta diferença foi acentuada quando comparadas as curvas de crescimento em UAB.

**Tabela 8. Taxa de crescimento específico das cepas GLp e GLpm**

Cepas	YPD	UAB+Leu	UAB
GLp (parental)	0.197 ± 0.002 a	0.176 ± 0.003 b	0.178 ± 0.001 b
GLpm ( $\Delta$ mpc1)	0.167 ± 0.001 c	0.096 ± 0.012 d	0.071 ± 0.004 e

As médias que não são seguidas pela mesma letra são significativamente diferentes entre si ( $P$ , 0,05), pelo teste de Tukey (média ± desvio padrão).

A adição de L-leucina ao meio UAB iria teoricamente restaurar o crescimento devido à ausência de *MPC1* nas cepas. Na cepa com *MPC1* intacto, GLp, não houve diferença significativa entre o crescimento em UAB com ou sem L-leucina (Tabela 8). Ao passo que, na cepa com deleção de *MPC1*, GLpm, a adição de L-leucina melhorou sutilmente a taxa de crescimento de 0,071 para 0,096 (Tabela 8). Esta discrepância apresentada pelas cepas corrobora a hipótese que a deleção de *MPC1* compromete a atividade do complexo Mpc. Além disso, este resultado está de acordo com o fenótipo observado em *S. cerevisiae* deficiente em Mpc1, que cresceu lentamente em meio definido sem aminoácidos e recuperado pela adição de valina e/ou L-leucina (HERZIG et al., 2012). Na literatura até o momento, os estudos que relatam a deleção de *MPC1* para a otimização de cepas utilizaram ou (i) meio de cultivo definido com a suplementação de aminoácidos (MORITA et al., 2019) ou (ii) meio rico (ZHANG et al., 2020a).

### 3.2.3 Efeito da ausência de Mpc1 na produção de ácido láctico em aerobiose

A deleção de *MPC1* foi realizada anteriormente em *S. cerevisiae* (MORITA et al., 2019) e em *A. oryzae* (ZHANG et al., 2020a) na produção de metabólitos derivados do piruvato. Porém, estas cepas foram testadas em meio rico ou em excesso de aminoácidos. Além disso, como mostrado na seção anterior, mesmo com a suplementação de leucina o crescimento de GLpm não foi restaurado por completo. Portanto, a fim de comparar as cepas em batelada em aerobiose, os cultivos foram feitos em meio YP com 4% de glicerol em biorreatores de bancada DASbox mini system (Eppendorf).

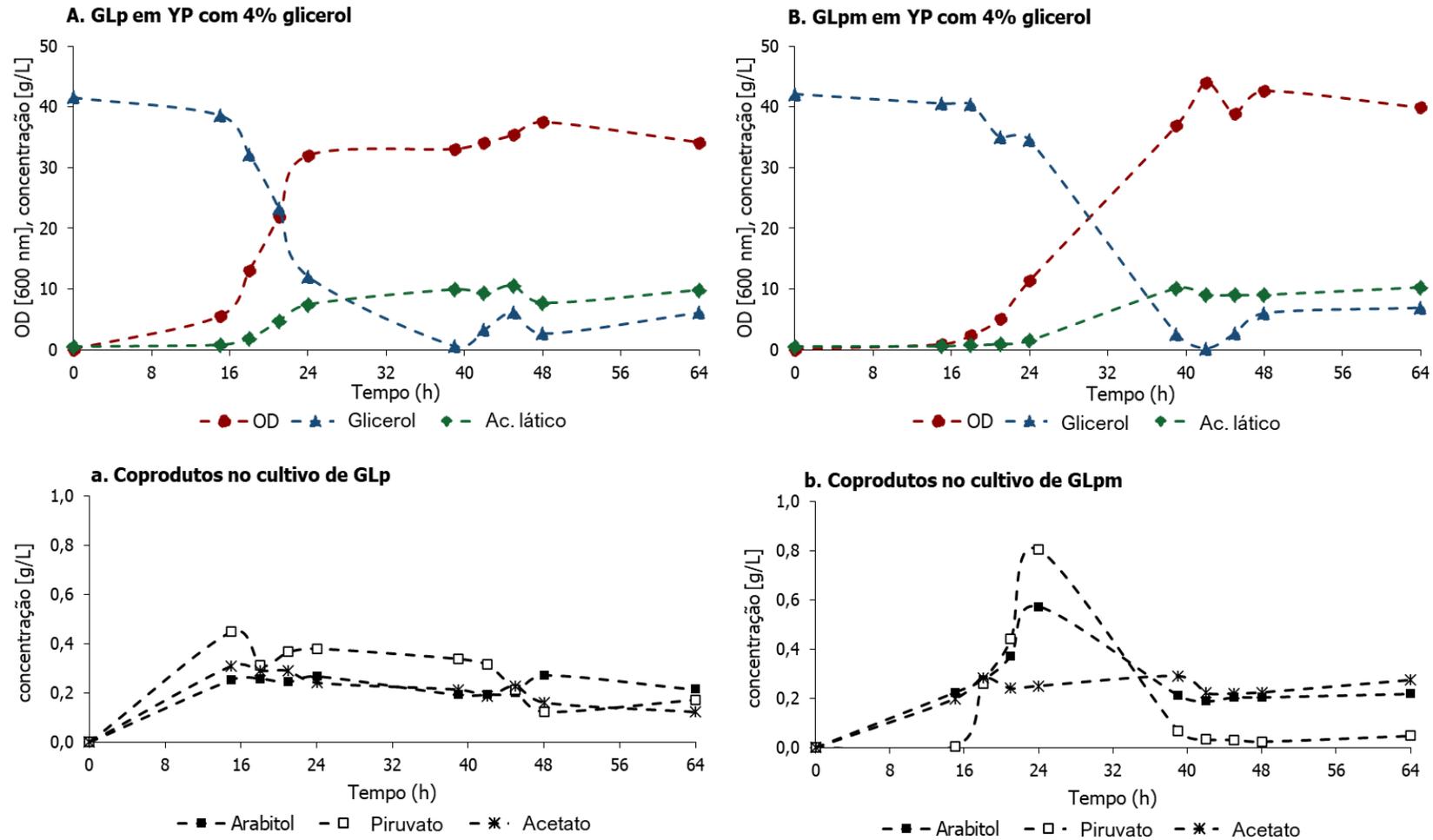
A curva de crescimento, a concentração de metabólitos e o consumo de glicerol no biorreator são mostrados na Figura 27. Os parâmetros cinéticos estão resumidos na Tabela 9.

**Tabela 9. Parâmetros cinéticos da produção de ácido láctico por GLp e GLpm em batelada em aerobiose**

Cepas	Taxa de crescimento específico ( $h^{-1}$ )	Produção (g/L)	Produtividade (g/L/h)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$
GLp (parental)	$0,308 \pm 0,001$	$10,57 \pm 0,55$	$0,145 \pm 0,025$	$0,230 \pm 0,003$	$0,523 \pm 0,021$
GLpm ( $\Delta mpc1$ )	$0,165 \pm 0,006$	$10,25 \pm 0,49$	$0,153 \pm 0,007$	$0,278 \pm 0,021$	$0,645 \pm 0,062$

Os valores representam a média das duplicatas dos cultivos.

Embora houvesse uma diferença na taxa de crescimento, como mostrado na seção anterior, aqui as curvas seguiram um padrão semelhante para as cepas GLp e GLpm em batelada em aerobiose (Figura 27). De fato, a produção (g/L), a produtividade (g/L.h) e o rendimento do ácido láctico foram semelhantes para ambas as cepas cultivadas em glicerol a 4% (Tabela 8). No entanto, a concentração de piruvato extracelular foi maior nas cepas de GLpm, o que poderia indicar um transbordamento de piruvato devido à deleção de *MPC1* (Figura 27B). Deve -se notar que, no caso da inibição química do *MPC* durante a prova de conceito com o inibidor UK-5509, o medicamento foi adicionado após a geração de biomassa na cultura, que não é a mesma situação que ter o transportador ausente desde o início, o que pode permitir que a levedura redirecione seu metabolismo.



**Figura 27. Curvas de crescimento, consumo de glicerol e produção de ácido láctico e coprodutos em GLP (A) e GLPm (B) do cultivo em batelada em aerobiose**

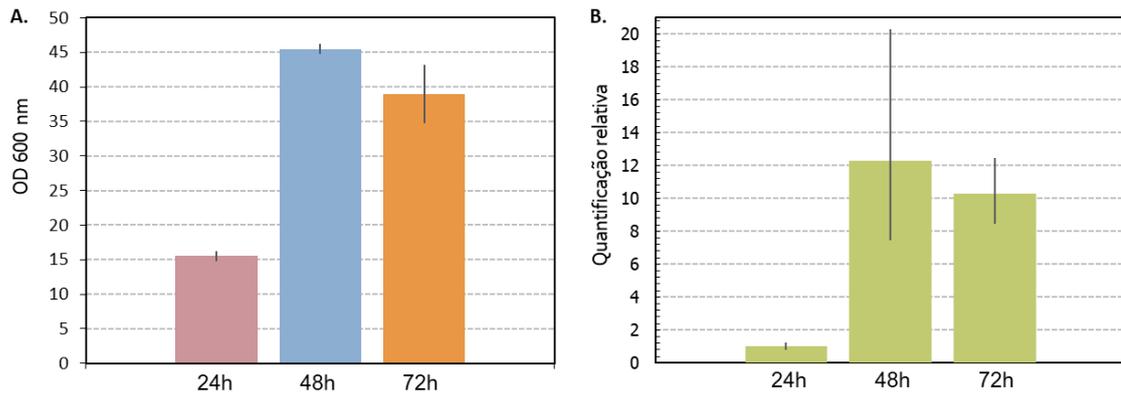
As curvas representam a média das replicatas biológicas.

Em cepas de *A. oryzae*, a dupla deleção *MPC1/PDC* teve um efeito sinérgico, resultando na produção de 81,2 g/L de ácido láctico a partir de 100 g/L de glicose (ZHANG et al., 2020a). Por outro lado, em cepas de *S. cerevisiae* construídas para a produção de 2,3-butanodiol, a deleção de *MPC1* aumentou 14,3 vezes a concentração do produto, enquanto o alvo para nocaute *ATG32*, responsável pela indução da mitofagia, resultou em um aumento de 23,3 vezes (MORITA et al., 2019). Para a produção de lactato de etila também em *S. cerevisiae*, a produção foi aumentada pelo nocaute do gene *POR2* responsável pela permeabilidade mitocondrial, enquanto que o nocaute do *MPC2* não teve efeito significativo (REN et al., 2020).

Por outro lado, a superexpressão dos genes *MPC* tem sido utilizada para aumentar a concentração de piruvato dentro das mitocôndrias na síntese de isobutanol em *S. cerevisiae*. A via biossintética do isobutanol em *S. cerevisiae* depende da conversão de piruvato em 2-cetoisovalerato dentro das mitocôndrias, e então a conversão em isobutiraldeído e isobutanol. A superexpressão de *MPC1* e *MPC3* resultou em um aumento de 22 vezes na produção de isobutanol da glicose na cepa de *S. cerevisiae* projetada (PARK; KIM; HAHN, 2016).

### 3.2.4 Expressão relativa do gene *vhb*

O gene da hemoglobina bacteriana de *V. stercoraria* foi expresso sob o promotor induzido por hipóxia ( $P_{ADH2}$  de *S. stipitidis*) a fim de avaliar a demanda por oxigênio intracelular durante o cultivo em batelada. A expressão de *vhb* já demonstrou melhorar a expressão recombinante em *K. phaffii* (CHEN et al., 2007; WANG; LI; LIU, 2016); no entanto, não resultou em melhorias na produção de ácido láctico. O RNA da cepa GLpm foi extraído de amostras coletadas durante o cultivo em batelada 4% glicerol em YP. A densidade celular dos três pontos do tempo de cultivo avaliados e a quantificação relativa de *vhb* em são mostradas à Figura 28.



**Figura 28. Quantificação relativa da hemoglobina bacteriana expressa em GLpm em batelada**

Legenda: **(A)** densidade celular em 24, 48 e 72 h do tempo de cultivo; **(B)** Quantificação relativa de RNA da hemoglobina bacteriana (*vhb*) de RNAs extraídos das amostras de 24, 48 e 72 h. O gene *ACT1* foi usado como controle endógeno. As barras indicam o desvio padrão entre dois experimentos.

A baixa solubilidade do oxigênio molecular pode ser um obstáculo a bioprocessos aeróbicos envolvendo leveduras Crabtree-negativas, como *K. phaffii*. Além disso, o uso do promotor ativado por hipóxia em *K. phaffii* já demonstrou resultar na produção de *vhb* somente quando as células requerem oxigênio intracelular (CHIEN; LEE, 2005).

A indução de *vhb* sob o comando de  $P_{ADH2}$  em 48 h de cultura (Figura 30) sugere que, mesmo sob aerobiose, existe uma hipóxia funcional quando a cultura atinge altas densidades celulares. Dado que a perda de *MPC1* reduziria o desempenho metabólico da levedura sob aerobiose, como mostrado nos resultados acima que indicam um retardo de crescimento da cultura, essa demanda de oxigênio pode sugerir que usar aerobiose pode ser um desafio para melhorar os rendimentos de ácido láctico neste microrganismo.

## 4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste capítulo, o efeito da deleção do gene *MPC1* na cepa GLpm demonstrou que, mesmo com evidência da inativação do complexo Mpc, sugerida pela auxotrofia demonstrada no cultivo em frascos e pelo acúmulo de piruvato durante as culturas em glicerol, isto não foi suficiente para melhorar a produção de ácido láctico em aerobiose quando comparada à da cepa parental.

Não foi possível concluir as razões pelas quais a estratégia de deleção de *MPC1*, benéfica para a produção de ácido láctico em *A. oryzae*, falhou em melhorar a produção em *K. phaffii*, visto que ambas as cepas apresentam as mesmas modificações: deleção de *Pdc1* e expressão da LDH bovina. Na cepa XL (X-33 pGAP-*BtLDH*), a presença de *Pdc1* não foi determinante para que houvesse a produção excessiva de acetato ou mesmo etanol (LIMA et al., 2016). Isto pode indicar que no metabolismo de *K. phaffii* há outros destinos possíveis para o piruvato além de seu consumo pela piruvato descarboxilase (*Pdc*).

Este resultado pode ser explicado se *K. phaffii* apresentar uma rota para desviar o piruvato para a mitocôndria mesmo na ausência de *Mpc1*. Uma alternativa seria a conversão de piruvato a oxaloacetato pela piruvato carboxilase, presente no citosol em *S. cerevisiae* (HAARASILTA; TASKINEN, 1977), seguida pela captação mitocondrial através do transportador de oxaloacetato (PALMIERI et al., 1999). Em uma busca BLASTp usando o transportador de oxaloacetato de *S. cerevisiae* (*Oac1*, Gene ID 853739) foi encontrada uma proteína anotada como sendo o ortólogo putativo no genoma de *K. phaffii* com 82% de similaridade (Gene ID 8197207). Quanto à piruvato carboxilase, uma isoforma citoplasmática foi anotada no GenBank sob o Gene ID 8198982.

A expressão de *vhb*, além de atuar como um sensor para a demanda de oxigênio intracelular, melhoraria o aporte do co-substrato necessário para a atividade de GPO. Do mesmo modo, a expressão no citosol da *NcCAT1* poderia atenuar os efeitos deletérios do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberados por GPO. Contudo, não foi possível gerar uma cepa que carregasse todas as estratégias, visto que XLm1 e XLm2 perderam o gene da *LDH* no processo de reciclagem de marca e contrasseleção. Desta maneira, não foi possível avaliar o efeito destas modificações em conjunto. Assim, não foi possível avaliar de fato o efeito da expressão de *GPO* com a deleção de *GPD1* (Capítulo 1 – cepas

GLp1 e GLp2), visto que foi demonstrado que o processo de reciclagem de marca pode resultar na alteração em outros *loci*.

Portanto, os resultados da cepa nocaute para Mpc1 e a expressão relativa de *vhb* em aerobiose nos levam a concluir que o processo de produção de ácido láctico tem mais chances de sucesso no paradigma de hipóxia, ao menos em *K. phaffii*.

## TERCEIRO CAPÍTULO: EXPRESSÃO DE DIFERENTES LDHS COM A SUPEREXPRESSÃO DE *JEN1*

### 1 INTRODUÇÃO

Leveduras não produzem o ácido láctico naturalmente, e, portanto, a escolha do gene da enzima lactato-desidrogenase (LDH) é um dos principais aspectos da produção heteróloga. Apesar de alguns fungos, como *A. oryzae*, possuírem genes nativos de LDH, estes podem não apresentar atividade enzimática suficiente para a produção em escala industrial. Neste caso, o gene nativo pode ser substituído por um gene de uma LDH considerada mais ativa (WAKAI et al., 2014).

As características que contribuem para a atividade catalítica, como pH e temperatura ótimos, assim como parâmetros cinéticos e de especificidade ( $k_{cat}$ ,  $K_m$ , coeficiente de especificidade e atividade específica) podem ser avaliados com o auxílio de bancos de dados, como por exemplo o BRENDA *Enzyme Database* (<http://www.brenda-enzymes.info/>). Nesta avaliação é importante levar em consideração as condições do processo e do organismo hospedeiro, a fim de não priorizar a atividade enzimática em detrimento de características essenciais. Por exemplo: apesar de a LDH de *Lactocaseibacillus casei* apresentar uma boa constante de especificidade, dada pela razão  $k_{cat}/K_M$ , o pH ótimo de atividade é de 5,4 e ela é inativa em pH 7,2; portanto, é incompatível com o ambiente intracelular. Há relatos na literatura em que as LDHs de *L. casei*, *Lactobacillus curvatus* e *Streptococcus uberis* foram expressas em *K. marxianus* e em *A. oryzae*, mas não apresentaram atividade (LEE et al., 2017; ZHANG et al., 2020a).

Na construção de cepas para a produção de ácido láctico, a otimização das vias competitivas para minimizar a formação de coprodutos pode resultar em um acúmulo do piruvato citosólico. Nestes casos, o acúmulo de substrato pode representar um gargalo limitante caso a enzima tenha um baixo número de renovação ( $k_{cat}$ ), ou seja, o valor máximo de substrato que pode ser convertido em produto por molécula de enzima por unidade de tempo. A dupla deleção de *PDC1/MPC1* em uma cepa de *A. oryzae* que expressa a LDH de *B. taurus* resultou no acúmulo intra- e extracelular de piruvato. Nesta cepa, apenas a substituição da LDH de *B. taurus* pela de *Lactococcus lactis* resultou em um aumento de 81,2 g/L para 90,1 g/L a partir de 100 g/L de glicose (ZHANG et al., 2020a). Conforme visto no capítulo anterior, a cepa GLpm

apresentou acúmulo de piruvato, o que sugere que uma LDH mais potente talvez seja uma solução em nosso modelo.

A inserção de várias cópias do gene de uma LDH ou a co-expressão de genes distintos pode ser uma alternativa para combinar atividade ou evitar o gargalo limitante da atividade enzimática. Na produção de D-lactato em *K. phaffii* a partir de metanol, nove cópias do gene da enzima D-LDH de *Leuconostoc mesenteroides* foram integradas no mesmo *locus*. Neste estudo, o número de cópias mostrou-se correlacionado ao aumento da atividade enzimática (coeficiente de correlação de 0,798) (YAMADA et al., 2019). No tocante à co-expressão, em *K. marxianus* a produção de ácido láctico dobrou na cepa que expressa em conjunto as LDHs de *Staphylococcus epidermidis* e *Lactobacillus acidophilus* em relação às cepas que expressavam as enzimas individualmente (LEE et al., 2017).

O aumento progressivo de acidez inerente ao processo de produção de ácido láctico pode impor dificuldades ao crescimento das leveduras e assim impactar negativamente o rendimento de produção ( $Y_{P/S}$ ). O ácido láctico apresenta baixo pKA, de 3,86, ou seja, em valores de pH mais próximo ao neutro, como o interior das células, o ácido láctico irá se dissociar em lactato e  $H^+$ . A liberação de prótons irá acarretar na acidificação intracelular. Para reestabelecer o pH neutro e o potencial de membrana plasmática, vários mecanismos de defesa podem ser usados pela célula, como a alteração da composição lipídica da membrana plasmática para diminuir a difusão de lactato, a exportação de ânions com ativação de  $H^+$ -ATPase de membrana e da V-ATPase vacuolar (KIM et al., 2019c).

O lactato não é capaz de atravessar a membrana plasmática por difusão. As formas dissociadas dos ácidos orgânicos devem ser transportadas para o exterior das células para auxiliar no processo de reestabelecimento do pH intracelular. Até o momento, dois transportadores de membrana descritos em *S. cerevisiae* existem, o transportador de monocarboxilatos, Jen1, e o transportador de acetato, Ady2 (PEETERMANS; FOULQUIÉ-MORENO; THEVELEIN, 2021). Entretanto, é provável que existam outros transportadores que realizam o efluxo de lactato em *S. cerevisiae* e que ainda não foram identificados (PACHECO et al., 2012).

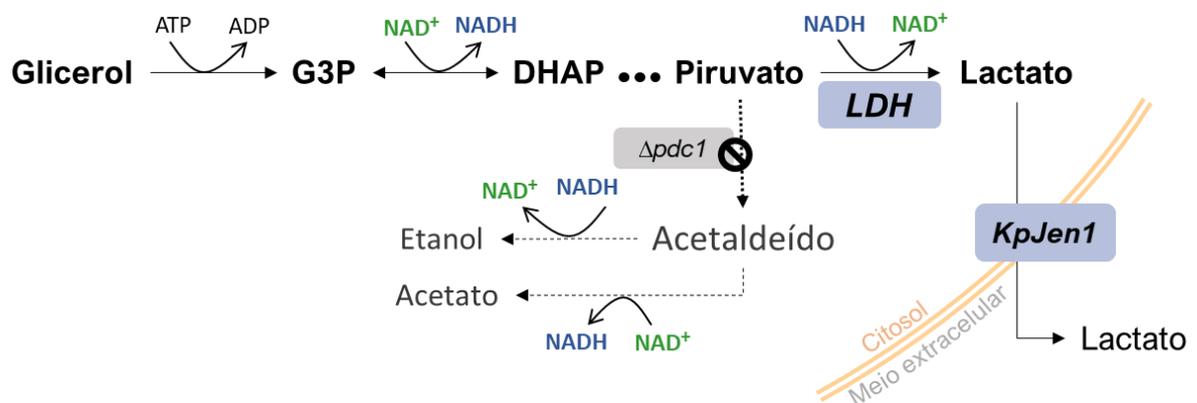
Em trabalho realizado por Pacheco e colaboradores (2012), A superexpressão de *JEN1* resultou em uma maior produção e rendimento de ácido láctico em *S. cerevisiae*, indicando que o transportador Jen1 pode tanto atuar na captação como na exportação de ácido láctico (PACHECO et al., 2012). Além de auxiliar na restauração do

pH intracelular, a superexpressão de *JEN1* estudos indicam que a exportação de lactato para o exterior da célula pode contribuir para a atividade de LDH, visto que o lactato citosólico reprime a atividade de LDH, na qual 10 g/L resultou em uma repressão em aproximadamente 40% da atividade de LDH (BRANDUARDI et al., 2006).

Em um trabalho anterior publicado por nosso grupo de pesquisa, foi feita uma análise BLAST (NCBI) no genoma de *K. phaffii* utilizando o gene *JEN1* de *S. cerevisiae*, resultando em uma ORF com 50,19% de similaridade como sendo o gene putativo do transportador em *K. phaffii*. A superexpressão de *KpJEN1* em cepas de *K. phaffii* resultou no aumento do rendimento de ácido láctico de 0,460 para 0,673 (g/g) em batelada-alimentada com limitação de oxigênio (LIMA et al., 2016).

## 1.1 OBJETIVO

Em vista do acima exposto, o objetivo deste capítulo foi reunir as duas estratégias em uma mesma cepa ao se avaliarem quatro genes de LDHs distintas concomitante à superexpressão de *KpJEN1* (Figura 29). Neste caso, todos os genes passaram por otimização de códons (GenScript Codon Optimizer) para expressão *K. phaffii*. Além disso, para contornar o problema da expulsão dos cassetes que foram clonados nos sítios GAP, conforme descrito nos capítulos 1 e 2, aqui as LDHs serão integradas no *locus* de *JEN1*, e a marca de seleção utilizada foi a marca auxotrófica *HIS4*. Portanto, a cepa Gp (GS115  $\Delta pdc1$  *his4*) foi selecionada (MELO et al., 2018).



**Figura 29. Transformações planejadas para a cepa Gp**

Fonte: A autora (2023). Legenda: G3P, gliceral-3-fosfato; DHAP, diidroxiacetona-fosfato; LDH: lactato-desidrogenase; *KpJen1*, simportador de monocarboxilatos nativo; *pdc1*, piruvato descarboxilase 1.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada na transformação, confirmação por PCR, reciclagem da marca de seleção, cultivo em biorreator e detecção de metabólitos em HPLC está descrita no Capítulo 1. Os métodos específicos deste capítulo estão descritos abaixo.

### 2.1 CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A ESCOLHA DE NOVAS LDHS

Na tabela 10 estão apresentados os critérios que foram avaliados na escolha das quatro LDHs que serão testadas neste capítulo. A LDH de *Bos taurus* foi escolhida apesar de sua baixa atividade específica (0,005 mmol/mg min, Tabela 10) por ser a enzima mais relatada na literatura em leveduras. Porém, aqui ela passou por otimização de códons para *K. phaffii*. Duas LDHs de BAL foram selecionadas. A LDH de *L. lactis* se mostrou muito eficaz em aumentar a produção de ácido láctico em organismos que apresentavam excesso de piruvato (ZHANG et al., 2020a). A segunda, proveniente de *Lactiplantibacillus plantarum*, foi selecionada por apresentar a maior constante de especificidade, dada pela razão  $k_{cat}/K_M$ , na grandeza de  $10^6$  (Tabela 10, BRENDA).

Já a LDH-2 de *Enterococcus mundtii* possui o maior  $k_{cat}$  já descrito para uma LDH (Tabela 10). Assim, esta LDH seria a mais indicada para operar em saturação de substrato, no caso o piruvato. Matoba e colaboradores (2014) geraram o mutante D241N de LDH-2, que apresentou atividade catalítica em pH neutro (MATOBA et al., 2014). Até o momento, não há relatos na literatura da produção de ácido láctico em leveduras que expressem a LDH de *E. mundtii*.

**Tabela 10. Critérios avaliados durante a escolha de LDHs**

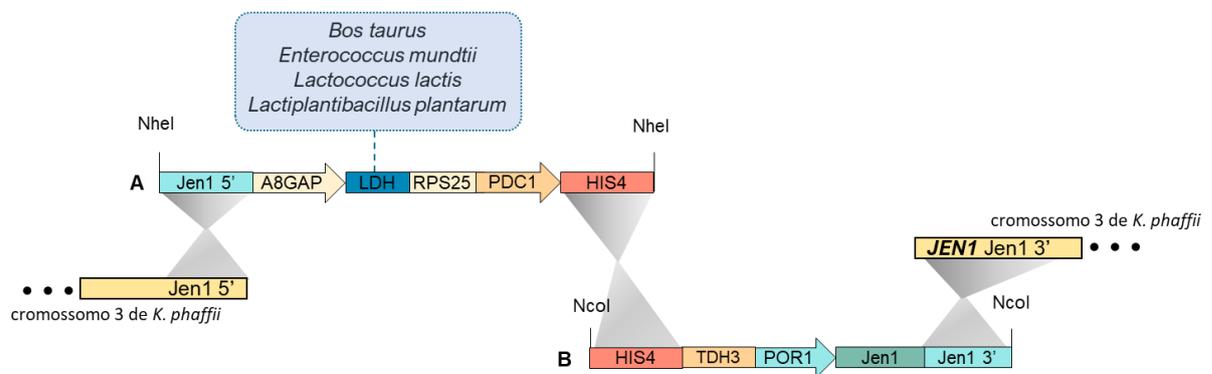
Características	<i>B. taurus</i> (LDH-A)	<i>L. lactis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>E. mundtii</i> LDH-2 D241N
pH	7,4	6,9	7,2	7,5
Temperatura, °C	25	25	25	37
$K_M$ , mM [piruvato]	0,05	1,5	0,5	3
$k_{cat}$ , $s^{-1}$	-	-	-	1800
Atividade específica, $mmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$	0,005	1,4	1,85	-
Constante de especificidade, $(k_{cat}/K_M)$ , $M^{-1} \cdot s^{-1}$	-	-	$2,3 \times 10^6$	$6 \times 10^5$

Fonte: BRENDA Enzyme Database (<http://www.brenda-enzymes.info/>).

## 2.2 CEPAS E PLASMÍDEOS

Dois cassetes complementares foram idealizados para resultar na expressão da LDH simultaneamente a superexpressão de *KpJEN1*. A recombinação de cassetes *in vivo* foi demonstrada em *K. phaffii* na expressão heteróloga de lipases (YU et al., 2012). Assim, para a integração correta, três eventos de recombinação homóloga deverão ocorrer: (1) entre a região 5' do cassete ao *locus* de *JEN1*, (2) entre os cassetes para reconstituir o gene *HIS4*, e (3) entre a região 3' do cassete ao *locus* de *JEN1*. A integração dos cassetes que expressam a LDH, a marca de seleção *HIS4* e o cassete de *KpJEN1* sob um promotor forte  $P_{POR1}$  (PRIELHOFER et al., 2017) irá resultar na interrupção do *locus* nativo de *KpJEN1* (Gene ID 8199569).

A estratégia de utilizar dois cassetes foi em razão de permitir a expressão de diferentes genes de LDHs apenas ao trocar a porção A, diminuindo assim o custo de síntese, e além disso, facilitar no processo de seleção de cepas, visto que são necessários três eventos de recombinação para a integração correta no *locus* e introdução de *HIS4* como ilustrado na Figura 30.



**Figura 30. Cassete de superexpressão de Jen1 com expressão do gene LDH sob o comando do promotor GAP otimizado ( $P_{A8GAP}$ )**

Legenda: A porção de expressão da LDH (A) poderá ser trocada para o teste de 4 genes provenientes de *B. taurus*, *E. mundtii*, *Lc. lactis*, *Lp. plantarum*. Para a integração no genoma de *K. phaffii*, três recombinações homólogas deverão ocorrer, entre as regiões de homologia com *Jen1* (extremidades) e entre os cassetes A e B para a restauração de *HIS4*.

Os genes das *LDHs* foram otimizados para leitura de códons mais usada em *K. phaffii* e serão expressos sob o comando do promotor  $P_{A8GAP}$ , proveniente de uma otimização do promotor  $P_{GAP}$  (PRIELHOFER et al., 2017). O gene *HIS4*, que irá

reconstituir a prototrofia a histidina, será expresso sob o promotor  $P_{PDC1}$  (PRIELHO-FER et al., 2017).

**Tabela 11. Plasmídeos e cepas utilizados para a deleção de MPC1**

<b>Plasmídeos e cepas</b>	<b>Utilização</b>	<b>Referência</b>
Jen1-LDH-HIS4a	Porção a do cassete: Carrega o cassete de expressão de <i>LDH</i> sob o comando do promotor nativo otimizado $P_{ABGAP}$ e metade do gene <i>HIS4</i> para recombinação entre os cassetes	Este trabalho
HIS4b-Jen1	Porção b do cassete: Carrega o cassete de expressão de <i>KpJEN1</i> sob o comando do promotor nativo $P_{POR1}$ e metade do gene <i>HIS4</i> para recombinação entre os cassetes	
GS115 Gp Gpm	GS115 <i>his4</i> GS115: $\Delta pdc$ <i>his4</i> Gp $\Delta mpc1$	Invitrogen Melo et al., 2018 Este trabalho

Fonte: A autora (2023).

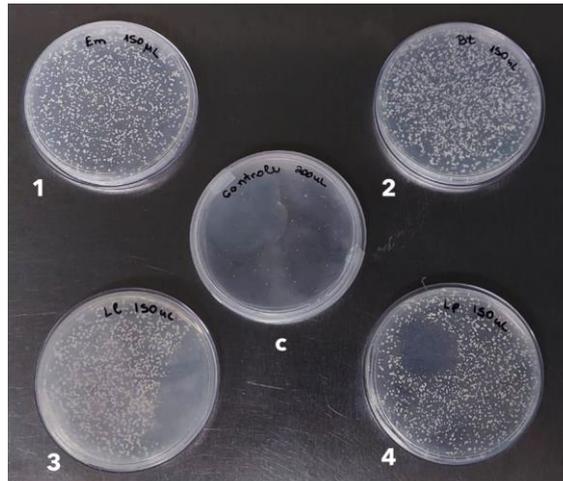
### 2.3 TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO

O método de transformação da cepa Gp seguiu o protocolo já descrito neste trabalho. As porções A e B foram amplificadas separadamente em reações de RCA e tratados com as endonucleases NcoI e NheI, respectivamente, para liberação dos cassetes. Para a transformação, foram misturados aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete A a 5  $\mu$ g do cassete B, em um volume inferior a 10  $\mu$ L.

Após a eletroporação de *K. phaffii*, por se tratar de uma marca de seleção auxotrófica, o tempo de recuperação foi reduzido de 3 h para 1 h, e as amostras foram então plaqueadas em meio de cultivo definido sem adição de aminoácidos, SD ágar (1,34% YNB sem aminoácidos, 2% dextrose, 1,5% ágar).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

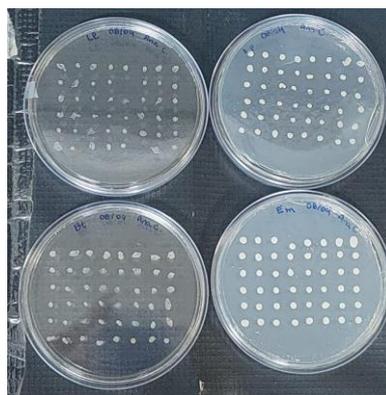
A Figura 31 mostra as placas após 72 h de incubação a 30 °C. As regiões onde não houve crescimento celular nas placas 3 e 4 pode ser em decorrência da gelificação não uniforme do ágar na hora de adicionar a solução estoque de dextrose.



**Figura 31. Placas de transformação em meio YNB s/ aminoácidos e 2% de dextrose**

Legenda: **C:** Controle, Gp + água. **1.** Gp + LDH de *E. mundtii*; **2.** Gp + LDH de *B. taurus*; **3.** Gp + LDH de *L. lactis*; **4.** Gp + LDH de *L. plantarum*.

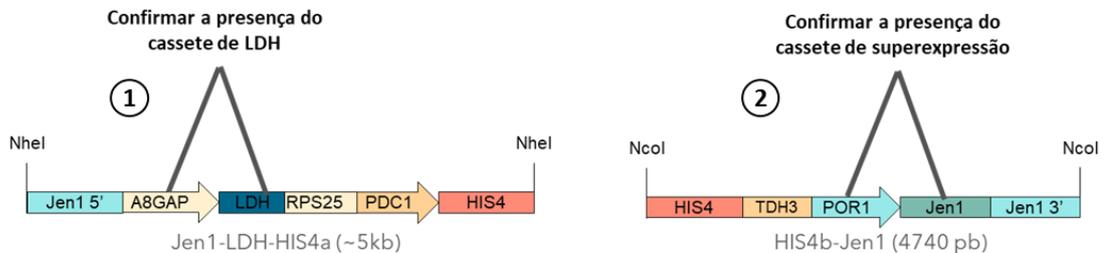
Ao todo, 192 colônias foram repicadas em novas placas, sendo 48 de cada placa de transformação como ilustrado na Figura 32.



**Figura 32. Placas de transformação de meio SD s/ aminoácidos indicando a seleção de clones prototróficos para histidina**

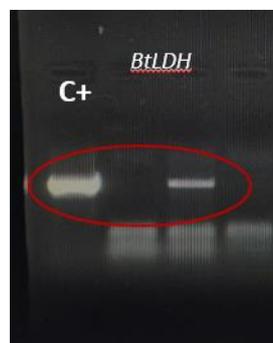
Na Figura 33 estão indicadas as reações de PCR para confirmar a integração dos cassetes. A primeira reação (Figura 33-1) com os iniciadores que se anelam

especificamente em cada LDH e no terminador *RPS25tt* para confirmar a presença do cassete de expressão de LDH; e um segundo par de oligonucleotídeos (Figura 33- 2) para a confirmação da superexpressão de *KpJEN1*.



**Figura 33. Estratégia para confirmação da inserção das duas porções do cassete**

Inicialmente, foram selecionadas 16 colônias (4 de cada placa) para avaliação por PCR de colônia, porém não houve amplificação em nenhuma das reações. Assim, 8 transformantes tiveram seu DNAg extraído (2 de cada LDH). Na Figura 34, porém só houve amplificação na reação 1 (confirmação de LDH) em um transformante que carrega *BtLDH*.



**Figura 34. Gel de agarose (1%) indicando a amplificação 697 pb que confirma a expressão de *BtLDH***

Legenda: C+. Plasmídeo

Inesperadamente, não houve amplificação ao avaliar este transformante com os oligonucleotídeos que confirmam a superexpressão de *KpJEN1*, visto que a estratégia foi delineada no intuito de que a recuperação da prototrofia indicasse a correta integração dos cassetes. Após mais uma rodada com a seleção de outros 18 transformantes de *BtLDH* e 13 clones de *LILDH*, nenhuma cepa apresentou a integração desejada.

Ao todo, foram testados aproximadamente 84 transformantes nestas duas reações, na qual apenas um apresentou a amplificação de *BtLDH*. Nas placas de transformação, não houve crescimento de colônias no controle negativo, indicando que a cepa não transformada não é capaz de crescer em meio SD, ou seja, é de fato auxotrófica para *HIS4*.

A cepa Gp foi construída pela integração do cassete que expressa o gene de resistência a G418 na cepa GS115 (MELO et al., 2018). A linhagem GS115 foi gerada por mutagênese de nitroguanidina na selvagem CBS7435 (NRRL Y-11430), resultando em mutações pontuais no gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) tornando-a auxotrófica para histidina (CREGG et al., 1985). Assim, esta linhagem precisa ser cultivada em meio rico ou em meio definido com a suplementação de histidina. Ao se inserirem os cassetes que possuem as regiões para recombinação de *HIS4*, nossa hipótese é que a porção final do cassete A tenha recombinado com o gene *HIS4* no genoma de Gp como ilustrado na Figura 35. Este evento poderia explicar a prototrofia apresentada pelos clones recuperados.

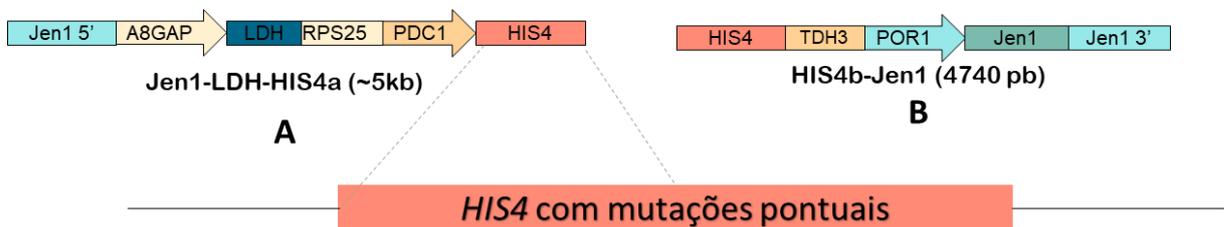


Figura 35. Evento de recombinação entre a região de homologia do cassete A e o gene de *HIS4* mutado de Gp

#### 4 CONCLUSÃO

Não foi possível gerar os clones para uma avaliação da estratégia.

## CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Após os repetidos esforços na otimização de cepas produtoras de ácido láctico em *K. phaffii*, concluímos que a cepa GLp cultivada em batelada-alimentada e com limitação de oxigênio é ainda a melhor candidata para a produção de ácido láctico a partir de glicerol, embora suas características ainda não preencham os requisitos postulados para competitividade comercial do PLA com plásticos de origem petroquímica.

Ao contrário do que foi observado na produção de ácido láctico em *A. oryzae*, a deleção de *MPC1* em *K. phaffii* não foi vantajosa, visto que acarreta na necessidade de utilização de meio de cultivo rico, o que pode encarecer o processo e dificultar a purificação do ácido láctico, sem que tenha havido ganhos de produção. As cepas de *K. phaffii* com e sem o *Mpc1* tiveram produção muito similar em aerobiose, aproximadamente 10 g/L em 4% de glicerol em meio rico.

Os estudos mais recentes sobre a produção de ácido láctico em leveduras indicam uma tendência em concentrar esforços em melhorar a tolerância a ácidos orgânicos. Esta otimização pode dispensar o uso de inúmeras modificações ao submeter a cepa a adaptação evolutiva em concentrações crescentes de ácido láctico. Estudos mostraram resultados promissores da utilização da adaptação evolutiva em laboratório para melhorar a produção de ácido láctico em *Pichia kudriavzevii* (PARK et al., 2018) e *S. cerevisiae* (JANG et al., 2021; ZHU et al., 2022). Esta é uma linha de investigação promissora também para *K. phaffii*.

Finalmente, é preciso reforçar que, a despeito do sucesso parcial das cepas GLp e GLpard, a busca por um microrganismo mais eficaz em produzir ácido láctico a partir de glicerol bruto deve continuar, uma vez que a competitividade comercial permanece um objetivo a ser alcançado. As observações deste trabalho indicam que o paradigma de aerobiose é inadequado para *K. phaffii*, e novas soluções devem ser procuradas em bioprocessos envolvendo hipóxia.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Painel Dinâmico de Produtores de Biodiesel**. Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiOTlkODYyODctMGJjNS00MGlyLWJmMWItNGJINDg0ZTg5NjBlliwidCI6ljQ0OTlmNGZmLTI0YTYtNGI0Mi1iN2VmLTEyNG-FmY2FkYzIxMyJ9&pageName=ReportSection8aa0cee5b2b8a941e5e0%22>>. Acesso em: 1 mar. 2023.
- AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 1 jun. 2014.
- ALBERT, H. et al. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 7, n. 4, p. 649–659, abr. 1995.
- ANASTÁCIO, G. S. et al. Utilization of glycerin byproduct derived from soybean oil biodiesel as a carbon source for heterologous protein production in *Pichia pastoris*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 505–510, 1 jan. 2014.
- ANSELL, R. et al. The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. **The EMBO journal**, v. 16, n. 9, p. 2179–2187, 1 maio 1997.
- ARRUDA, A. et al. A constitutive expression system for *Pichia pastoris* based on the PGK1 promoter. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 3, p. 509–517, mar. 2016.
- ATA, Ö. et al. What makes *Komagataella phaffii* non-conventional? **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 8, p. foab059, 1 dez. 2021.
- BAE, J.-H. et al. Direct fermentation of Jerusalem artichoke tuber powder for production of L-lactic acid and D-lactic acid by metabolically engineered *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Biotechnology**, v. 266, p. 27–33, 20 jan. 2018.
- BAEK, S.-H. et al. Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2737–2748, 1 mar. 2016.
- BAEK, S.-H. et al. Improvement of D-Lactic Acid Production in *Saccharomyces cerevisiae* Under Acidic Conditions by Evolutionary and Rational Metabolic Engineering. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 10, p. 1700015, 2017.
- BAGHERI, A. R. et al. Fate of So-Called Biodegradable Polymers in Seawater and Freshwater. **Global Challenges**, v. 1, n. 4, p. 1700048, 2017.
- BAUMANN, K. et al. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. **BMC Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 141, 22 out. 2010.
- BENDER, T.; MARTINOU, J.-C. The mitochondrial pyruvate carrier in health and disease: To carry or not to carry? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular**

**Cell Research**, Channels and transporters in cell metabolism. v. 1863, n. 10, p. 2436–2442, 1 out. 2016.

BENDER, T.; PENA, G.; MARTINOU, J.-C. Regulation of mitochondrial pyruvate uptake by alternative pyruvate carrier complexes. **The EMBO Journal**, v. 34, n. 7, p. 911–924, abr. 2015.

BRANDUARDI, P. et al. Lactate production yield from engineered yeasts is dependent from the host background, the lactate dehydrogenase source and the lactate export. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 4, 30 jan. 2006.

BRICKER, D. K. et al. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6090, p. 96–100, 6 jul. 2012.

BRZEZIŃSKI, M.; BIELA, T. Stereocomplexed Polylactides. Em: KOBAYASHI, S.; MÜLLEN, K. (Eds.). **Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 1–10.

BUTTERWICK, K.; LOWE, N. J. Injectable poly-L-lactic acid for cosmetic enhancement: Learning from the European experience. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 2, p. 281–293, 1 ago. 2009.

CASTILLO MARTINEZ, F. A. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 70–83, 1 mar. 2013.

CHEN, H. et al. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1205–1212, abr. 2007.

CHIEN, L.-J.; LEE, C.-K. Expression of Bacterial Hemoglobin in the Yeast, *Pichia pastoris*, with a Low O<sub>2</sub>-Induced Promoter. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 19, p. 1491–1497, 1 out. 2005.

CHOL, C. G. et al. Purification of crude glycerol derived from biodiesel production process: Experimental studies and techno-economic analyses. **Fuel Processing Technology**, v. 178, p. 78–87, 1 set. 2018.

CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 12, p. 3376–3385, dez. 1985.

DAVE, K. K.; PUNEKAR, N. S. Expression of Lactate Dehydrogenase in *Aspergillus niger* for L-Lactic Acid Production. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0145459, 18 dez. 2015.

DE FRANÇA, J. O. C. et al. Polymers Based on PLA from Synthesis Using D,L-Lactic Acid (or Racemic Lactide) and Some Biomedical Applications: A Short Review. **Polymers**, v. 14, n. 12, p. 2317, jan. 2022.

DEAN, F. B. et al. Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. **Genome Research**, v. 11, n. 6, p. 1095–1099, jun. 2001.

DEQUIN, S.; BARRE, P. Mixed Lactic Acid–Alcoholic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH. **Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 173–177, fev. 1994.

DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A. et al. Towards sustainability of lactic acid and poly-lactic acid polymers production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 108, p. 238–252, 1 jul. 2019.

GHAFFAR, T. et al. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 222–229, 1 abr. 2014.

GRAND VIEW RESEARCH, INC. **Lactic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By Raw Material (Sugarcane, Corn, Cassava), By Application (PLA, Food & Beverages), By Region, And Segment Forecasts, 2021 - 2028.**

HAARASILTA, S.; TASKINEN, L. Location of three key enzymes of gluconeogenesis in baker's yeast. **Archives of Microbiology**, v. 113, n. 1–2, p. 159–161, 13 maio 1977.

HAIDER, T. P. et al. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 1, p. 50–62, 2019.

HALESTRAP, A. P. The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 148, n. 1, p. 85–96, abr. 1975.

HARJU, S.; FEDOSYUK, H.; PETERSON, K. R. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. **BMC Biotechnology**, v. 4, p. 8, 21 abr. 2004.

HEISTINGER, L.; GASSER, B.; MATTANOVICH, D. 2020. Microbe Profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*. **Microbiology**, v. 166, n. 7, p. 614–616, 28 jul. 2020.

HERZIG, S. et al. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6090, p. 93–96, 6 jul. 2012.

HOU, Q. et al. Identification and application of novel low pH-inducible promoters for lactic acid production in the tolerant yeast *Candida glycerinogenes*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, n. 1, p. 8–12, 1 jul. 2019.

ILMÉN, M. et al. Production of L-lactic acid by the yeast *Candida sonorensis* expressing heterologous bacterial and fungal lactate dehydrogenases. **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 53, 25 maio 2013.

JANG, B.-K. et al. L-Lactic Acid Production Using Engineered *Saccharomyces cerevisiae* with Improved Organic Acid Tolerance. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 928, nov. 2021.

JEONG, E.; SHIM, W. Y.; KIM, J. H. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. 28–36, 20 set. 2014.

JIAO, J. et al. Basal transcription profiles of the rhamnose-inducible promoter PLRA3 and the development of efficient PLRA3-based systems for markerless gene deletion and a mutant library in *Pichia pastoris*. **Current Genetics**, v. 65, n. 3, p. 785–798, 1 jun. 2019.

KAUR, J. et al. Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00487, 1 set. 2020.

KIM, J. et al. Lactic Acid Production from a Whole Slurry of Acid-Pretreated Spent Coffee Grounds by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 1, p. 206–216, 1 set. 2019a.

KIM, J.-W. et al. Deletion of glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes improved 2,3-butanediol production by reducing glycerol production in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 304, p. 31–37, 10 out. 2019b.

KIM, M. S. et al. Activation of Haa1 and War1 transcription factors by differential binding of weak acid anions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 3, p. 1211–1224, 20 fev. 2019c.

KLEIN, M. et al. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 878–893, 2017.

KOIVURANTA, K. T. et al. L-lactic acid production from D-xylose with *Candida sonorensis* expressing a heterologous lactate dehydrogenase encoding gene. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 107, 8 ago. 2014.

KONG, X. et al. Efficient L-lactic acid production from corncob residue using metabolically engineered thermo-tolerant yeast. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 220–230, 1 fev. 2019.

KUMAR, L. R. et al. Identifying economical route for crude glycerol valorization: Biodiesel versus polyhydroxy-butyrate (PHB). **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124565, 1 mar. 2021.

KURTZMAN, C. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1435, 1 nov. 2009.

KURTZMAN, C. P. *Komagataella* Y. Yamada, Matsuda, Maeda & Mikata (1995). Em: **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 5. ed. [s.l.] Elsevier, 2011. v. 1.

LEE, J. W. et al. Co-expression of two heterologous lactate dehydrogenases genes in *Kluyveromyces marxianus* for L-lactic acid production. **Journal of Biotechnology**, v. 241, p. 81–86, 10 jan. 2017.

- LEE, J. Y. et al. Engineering cellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae* for improved production of L-lactic acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 751–758, 2015.
- LI, D. et al. A Novel Vector for Construction of Markerless Multicopy Overexpression Transformants in *Pichia pastoris*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- LI, F. et al. Production of L-Lactic Acid in *Saccharomyces cerevisiae* Through Metabolic Engineering and Rational Cofactor Engineering. **Sugar Tech**, v. 24, n. 4, p. 1272–1283, 1 ago. 2022.
- LIMA, P. B. A. et al. Novel homologous lactate transporter improves L-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 158, 15 set. 2016.
- LIN-CEREGHINO, J. et al. Direct selection of *Pichia pastoris* expression strains using new G418 resistance vectors. **Yeast**, v. 25, n. 4, p. 293–299, 2008.
- LIU, B. et al. Discovery of a rhamnose utilization pathway and rhamnose-inducible promoters in *Pichia pastoris*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27352, 3 jun. 2016.
- MATOBA, Y. et al. An alternative allosteric regulation mechanism of an acidophilic L-lactate dehydrogenase from *Enterococcus mundtii* 15-1A. **FEBS open bio**, v. 4, p. 834–847, 2014.
- MATTANOVICH, D. et al. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 29, 2 jun. 2009.
- MAZUMDAR, S. et al. Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 7, 25 jan. 2013.
- MELO, N. T. M. et al. Effect of Pyruvate Decarboxylase Knockout on Product Distribution Using *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) Engineered for Lactic Acid Production. **Bioengineering**, v. 5, n. 1, p. 17, mar. 2018.
- MELO, N. T. M. et al. Evaluation of Product Distribution in Chemostat and Batch Fermentation in Lactic Acid-Producing *Komagataella phaffii* Strains Utilizing Glycerol as Substrate. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. E781, 22 maio 2020.
- MELO, N. T. M. **Estudo do metabolismo de *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*): visando maximizar a produção de ácido láctico**. Doutorado—Brasília, DF: Universidade Católica de Brasília, 2021.
- MORITA, K. et al. Repression of mitochondrial metabolism for cytosolic pyruvate-derived chemical production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–11, dez. 2019.
- NIU, D. et al. Highly efficient L-lactate production using engineered *Escherichia coli* with dissimilar temperature optima for L-lactate formation and cell growth. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 78, 29 maio 2014.

NOVY, V. et al. Toward “homolactic” fermentation of glucose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring a kinetically efficient l-lactate dehydrogenase within *pdc1-pdc5* deletion background. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 1, p. 163–171, 2017.

PACHECO, A. et al. Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by expression of the monocarboxylate transporters Jen1 and Ady2. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 3, p. 375–381, 1 maio 2012.

PALMIERI, L. et al. Identification of the Yeast Mitochondrial Transporter for Oxaloacetate and Sulfate \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 32, p. 22184–22190, 6 ago. 1999.

PARK, H. J. et al. Low-pH production of d-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 9, p. 2232–2242, 2018.

PARK, S.-H.; KIM, S.; HAHN, J.-S. Improvement of isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by increasing mitochondrial import of pyruvate through mitochondrial pyruvate carrier. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7591–7598, 1 set. 2016.

PEETERMANS, A.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Mechanisms underlying lactic acid tolerance and its influence on lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell**, v. 8, n. 6, p. 111–130, 2021.

PIVA, L. C. **Uso do gene *amdS* (acetamidase) como marca de seleção dominante em *Pichia pastoris***. Mestrado—[s.l.] Universidade de Brasília, 2 fev. 2015.

POHANKA, M. D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 3419034, 17 jun. 2020.

POTAPOVICH, M. V. et al. Isolation, Purification, and Characterization of Catalase from the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, n. 6, p. 646–657, 1 jun. 2001.

PRIELHOFER, R. et al. GoldenPiCS: a Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris*. **BMC Systems Biology**, v. 11, n. 1, p. 123, 8 dez. 2017.

RAMOS, T. G. S. et al. Xylonic acid production by recombinant *Komagataella phaffii* strains engineered with newly identified xylose dehydrogenases. **Bioresource Technology Reports**, v. 16, p. 100825, 1 dez. 2021.

REN, J. et al. Enhanced Production of Ethyl Lactate in *Saccharomyces cerevisiae* by Genetic Modification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 47, p. 13863–13870, 25 nov. 2020.

SAUER, M. et al. 16 years research on lactic acid production with yeast – ready for the market? **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 27, n. 1, p. 229–256, 1 jan. 2010.

SAUER, M. et al. The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 756–769, 1 ago. 2017.

SCHLIEBS, W. et al. A Eukaryote without Catalase-Containing Microbodies: *Neurospora crassa* Exhibits a Unique Cellular Distribution of Its Four Catalases. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 9, p. 1490–1502, set. 2006.

SCORER, C. A. et al. Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of *Pichia pastoris* for High-level Foreign Gene Expression. **Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 181–184, fev. 1994.

SHEDLOVSKIY, D.; SHCHERBIK, N.; PESTOV, D. G. One-step hot formamide extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. **RNA biology**, v. 14, n. 12, p. 1722–1726, 2 dez. 2017.

SINGH, H. B. et al. Developing methylotrophic microbial platforms for a methanol-based bioindustry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022.

SIRIPONG, W. et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isobutanol and isobutyl acetate. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1, 8 jan. 2018.

SIRIPONG, W. et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isopentanol (3-Methyl-1-butanol). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 138, p. 109557, 1 ago. 2020.

SONG, J.-Y. et al. Introduction of a bacterial acetyl-CoA synthesis pathway improves lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 35, p. 38–45, 1 maio 2016.

TAMAKAWA, H.; IKUSHIMA, S.; YOSHIDA, S. Efficient production of L-lactic acid from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 1, p. 73–75, 1 jan. 2012.

TURNER, T. L. et al. Lactic acid production from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 1075–1083, 2016.

WAKAI, S. et al. L-lactic acid production from starch by simultaneous saccharification and fermentation in a genetically engineered *Aspergillus oryzae* pure culture. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 376–383, 1 dez. 2014.

WANG, J.; LI, Y.; LIU, D. Improved Production of *Aspergillus usamii* endo- $\beta$ -1,4-Xylanase in *Pichia pastoris* via Combined Strategies. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 3265895, 2016.

WRIESSNEGGER, T. et al. Production of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone by metabolic engineering of *Pichia pastoris*. **Metabolic Engineering**, v. 24, p. 18–29, 1 jul. 2014.

WU, S.; LETCHWORTH, G. J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. **BioTechniques**, v. 36, n. 1, p. 152–154, jan. 2004.

YAMADA, R. et al. Enhanced d-lactic acid production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* following optimization of the global metabolic pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 9, p. 2075–2084, 2017.

YAMADA, R. et al. Toward the construction of a technology platform for chemicals production from methanol: d-lactic acid production from methanol by an engineered yeast *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 37, 4 fev. 2019.

YANG, J. et al. Hygromycin-resistance vectors for gene expression in *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 31, n. 4, p. 115–125, 2014.

YANG, J.; JIANG, W.; YANG, S. *mazF* as a counter-selectable marker for unmarked genetic modification of *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 4, p. 600–609, 1 jun. 2009.

YU, X.-W. et al. Enhanced thermostability of a *Rhizopus chinensis* lipase by in vivo recombination in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 102, 6 ago. 2012.

ZHANG, Q. et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for myo-inositol production by dynamic regulation of central metabolism. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 112, 3 jun. 2022.

ZHANG, S. et al. Pyruvate metabolism redirection for biological production of commodity chemicals in aerobic fungus *Aspergillus oryzae*. **Metabolic Engineering**, v. 61, p. 225–237, 1 set. 2020a.

ZHANG, X. et al. Production of lycopene by metabolically engineered *Pichia pastoris*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 84, n. 3, p. 463–470, 3 mar. 2020b.

ZHAO, J. et al. Homofermentative production of optically pure L-lactic acid from xylose by genetically engineered *Escherichia coli* B. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 57, 7 jun. 2013.

ZHONG, W. et al. Systematically redesigning and optimizing the expression of D-lactate dehydrogenase efficiently produces high-optical-purity D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 217–226, 15 abr. 2019.

ZHONG, W. et al. Improvement of D-lactic acid production at low pH through expressing acid-resistant gene *loGAS1* in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 732–742, 2021.

ZHU, P. et al. Metabolic Engineering and Adaptive Evolution for Efficient Production of L-Lactic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 6, p. e02277-22, 10 nov. 2022.

## APÊNDICE 1. ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

As endonucleases de restrição que foram utilizadas para liberar cassetes de transformação ou linearizar plasmídeos usados para integração em *K. phaffii*

Enzima (isosquizô- mero mais conhecido)	Sítio de cli- vagem (5' – 3')	Tampão	Fornecedor	Temperatura	Material tra- tado
Bcul (SpeI)	A <sup>+</sup> CTAGT	FastDigest	ThermoFisher Scientific	37 °C	1-gpo e 2- gpo_cat
SmaI	CCC <sup>+</sup> GGG	FastDigest	ThermoFisher Scientific	37 °C	mpc-vhb
XhoI	C <sup>+</sup> TCGAG	FastDigest	ThermoFisher Scientific	37 °C	mpc-vhb
XmaJI (AvrII)	C <sup>+</sup> CTAGG	FastDigest	ThermoFisher Scientific	37 °C	pGAP-LDH
NheI	G <sup>+</sup> CTAGC	rCutSmart	New England Biolabs	37 °C	Jen1-LDH- HIS4a
NcoI	C <sup>+</sup> CATGG	rCutSmart	New England Biolabs	37 °C	HIS4b-Jen1

As enzimas utilizadas que apresentam a tecnologia *FastDigestion* (Thermo Fisher Scientific) permite um tempo de incubação mínimo de 5 min a 37 °C, porém todas as reações foram incubadas por período mínimo de 8h (*overnight*).

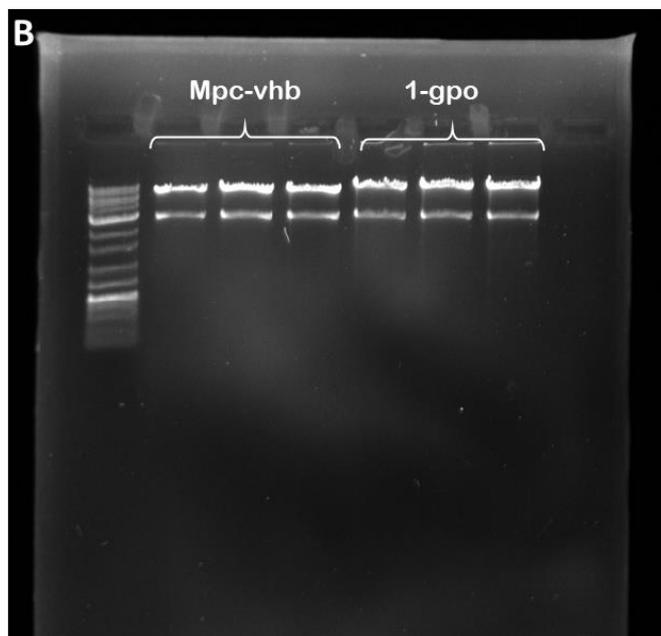
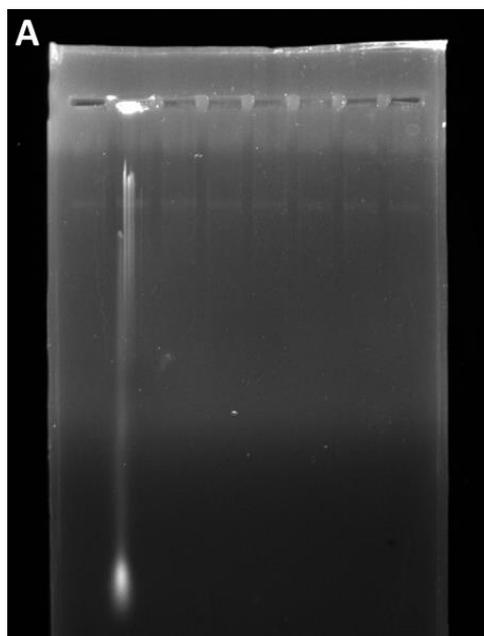
## APÊNDICE 2. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Nome	Sequência (5' – 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Descrição
GPD1F	GCTCGCACTAAAGGCTACTTCTC	60	Deleção de <i>GPD1</i>
GPD1R	CCAGCGATATCCTCAATAACTTGC	58	
A-GPOF	AAGGAGAACCAATACGATTTG	58	Confirma a presença dos cassetes gpo (1 e 2)
A-GPOR	GTTAGCGTTAGGGAATCTG	56	
DR-3'GPD1F	GTACCGCTAGCTTCCACAGAC	60	Confirmar a inserção do cassete no <i>locus</i>
PFD1R	GAATACGAGTCATTGCCAATTC	54	
RPS3F	CAAAGTAGCACAACACGC	53	Confirmar a reciclagem de marca nos cassetes gpo (1 e 2)
DR1-GPD1R	GCGGTACCCCTTCTCG	57	
MPC1F	CTCAGATCGATAGAGTGCAAG	56	Deleção de <i>MPC1</i>
MPC1R	GGAGAAGCTCCATTCGAC	55	
qVHbR	AACAACCTCCTGACCGACGATAG	58	Com MPC1F confirma a presença do cassete
pADH2R	GGTACGTGATAAACTGAGTCC	59	Confirmar a inserção do cassete no <i>locus</i>
RAD9F	GCTAGCAGAGGTAGAAGATAC	58	
ADH2-DR2F	ACCTGAGCTCTTACTTTGATC	54	Com MPC1R confirma a reciclagem de marca do cassete mpc-vhb
pGAPf2	GGAAACCACCAGAATCGAATATA	55	Confirma a presença do cassete pGAP-LDH <sup>+</sup>
3'-AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	56	
qVHbF	CATCTTGCCAGCCGTTAAGAAG	60	Quantificação relativa do gene <i>vhb</i>
qVHbR	AACAACCTCCTGACCGACGATAG		
qACT1F	TGTTGGTTGTCCTCGGTTGA	60	Controle constitutivo para qPCR
qACT1R	TGAGCTTGGATTTCGGCAGAT		
qCAT1F	ACTGCTGCTAACGGTTCTACTG	64	Quantificação relativa do gene <i>NcCAT1</i>
qCAT1R	AGCTTTAGCACACCAGGAATG		

### APÊNDICE 3. GÉIS DE AGAROSE DO MATERIAL GENÉTICO PARA TRANSFORMAÇÃO

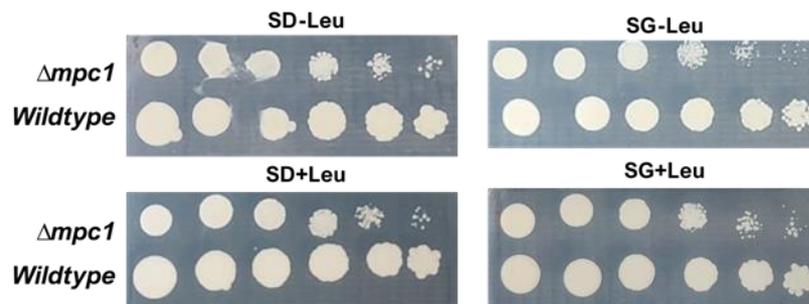
**A.** Gel de agarose (0,8 %) mostrando o resultado da reação de amplificação RCA. 0,5  $\mu$ L foram aplicados no gel. O rastro indica a presença dos concatêmeros.

**B.** Gel de agarose (1%) mostrando o resultado do tratamento do produto da reação de RCA dos liberando os cassetes Mpc-vhb (SmaI e XhoI) e 1-gpo (BclI).



## APÊNDICE 4. SPOT ASSAY

A fim de avaliar o fenótipo da auxotrofia gerado pela deleção de *MPC1*, o teste descrito por Morita e colaboradores em *S. cerevisiae* deficiente em *MPC1*, que consiste em plaquear gotas das culturas serialmente diluídas em placas contendo meio de cultivo com e sem a suplementação de aminoácidos, foi feito para comparar a cepa gerada Xm (X-33  $\Delta mpc1$ ) e a selvagem X-33. Aqui, foram utilizadas placas de meio sintético preparados com 1.34% de meio base de nitrogênio de levedura com sulfato de amônio (YNB) e a fonte de carbono (SD, dextrose; SG, glicerol), com ou sem a suplementação de solução de leucina (100X, 60 mg/mL). A figura abaixo mostra as placas após 48 h de incubação a 30°C.

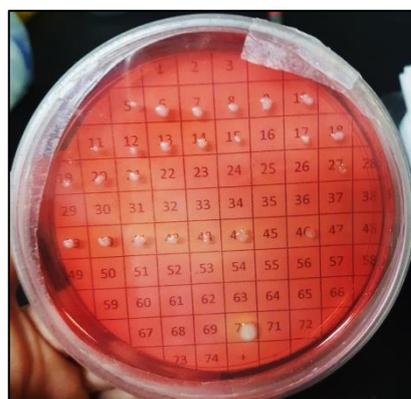
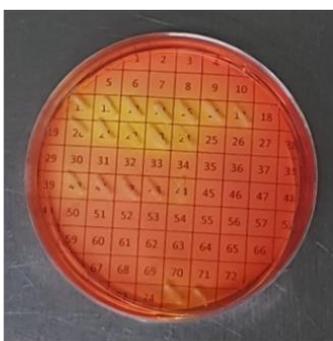
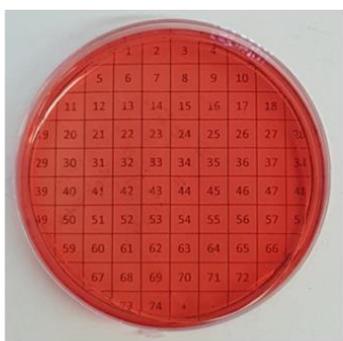


### Teste preliminar do fenótipo de GLpm em meio definido

Legenda:  $\Delta mpc1$ : X-33  $\Delta mpc1$  e *wildtype*: X-33. A OD<sub>600</sub> das culturas plaqueadas por gotejamento são, da esquerda para direita, 0,5, 0,1, 0,02, 0,004, 0,0008 e 0,00016.

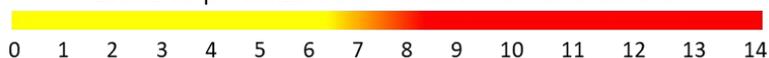
## APÊNDICE 5. MEIO DIFERENCIAL PARA A SELEÇÃO DE CLONES PRODUTORES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Durante o processo de seleção de clones, foram utilizadas placas seletivas (0,2 mg/mL) que foram suplementadas com 18 mg/L de vermelho de fenol para tornar o meio diferencial em resposta a liberação de ácido. O vermelho fenol é considerado um indicador de pH, variando de vermelho (básico) a amarelo (ácido). As placas seletivas podem auxiliar no processo de avaliação inicial de clones. Porém, este método não foi validado qualitativamente, ou seja, a zona de clareamento não foi correlacionada a uma maior liberação de ácido lático.

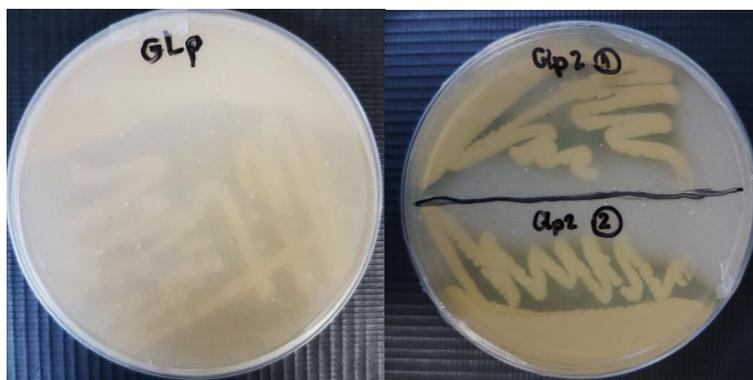


YPD (18mg/L de vermelho de fenol)

Escala de pH utilizando o indicador vermelho de fenol



Outra alternativa é a adição de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) visto que a liberação de ácido lático resulta na hidrólise deste sal gerando zonas de clareamento.



## APÊNDICE 6. PRODUÇÕES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO

### 1. Artigos aceitos para publicação

- 2021 – Produção científica: MANFRÃO'NETTO, JOÃO H. C.; QUEIROZ, ENZO BENTO; **OLIVEIRA JUNQUEIRA, ANA C.**; GOMES, ANTÔNIO M. V.; GUSMÃO DE MORAIS, DANIEL; PAES, HUGO COSTA; PARACHIN, NÁDIA SKORUPA. Genetic strategies for improving hyaluronic acid production in recombinant bacterial culture. *Journal Of Applied Microbiology*, v. 132, p. 822-840, 2021.
- 2023 – **DE OLIVEIRA JUNQUEIRA, ANA CAROLINE**; MOREIRA MELO, NADIELLE TAMIRES; SKORUPA PARACHIN, NÁDIA; COSTA PAES, HUGO. Loss of a Functional Mitochondrial Pyruvate Carrier in *Komagataella phaffii* Does Not Improve Lactic Acid Production from Glycerol in Aerobic Cultivation. *Microorganisms*, v. 11, p. 483, 2023.

### 2. Apresentação de poster (Internacional):

- 2022 – **JUNQUEIRA, ANA CAROLINE DE OLIVEIRA**; MELO, N. T. M.; PARACHIN, NÁDIA SKORUPA; PAES, H. C. Disruption of Subunit 1 of the Mitochondrial Pyruvate Carrier (Mpc1) in the Obligate Aerobe *Komagataella Phaffii* for Lactic Acid Production under Aerobic Cultivation. In: 36th International Specialised Symposium on Yeasts (ISSY36), 2022, Vancouver, Canada.

### 3. Apresentação de poster (Nacional):

- 2019 – **JUNQUEIRA, A. C. O.**; GOMES, A. M. V.; PARACHIN, N. S. Superexpressão de genes em *Kluyveromyces lactis* modificada para a produção de ácido hialurônico. In: IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, 2019, Brasília.
- 2021 – **JUNQUEIRA, A. C. O.**; MELO, N. T. M.; PAES, H. C.; PARACHIN, N. S. Metabolic engineering of *K. phaffii* for L-lactate production in aerobiosis from crude glycerol. In: X Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, 2021, Brasília.
- 2022 – **JUNQUEIRA, ANA C. DE O.**; MELO, N. T. M.; PARACHIN, N. S.; PAES, H.C. Evaluation of lactic acid production under aerobic cultivation by an Mpc1-deficient strain of *Komagataella phaffii*. In: XI Simpósio do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília, 2022, Brasília.

### 4. Outros

- 2021 – **JUNQUEIRA, ANA C. DE O.** Campanha de Divulgação Científica - Extend 10 anos. 2021; Tema: Biotecnologia para a produção de bioplástico. (Rede social).
- 2021 – **JUNQUEIRA, ANA C. DE O.** Apresentação em comemoração ao Dia Internacional de Meninas e Mulheres na Ciência no II POSTGRADUATE SYMPOSIUM IN MICROBIAL BIOLOGY – Post-pandemic scientific challenges and sustainable perspectives (Virtual).